

Terminalia macroptera

*Immunmodulerende polysakkarider fra Terminalia macroptera
og etnofarmakologisk informasjon om to maliske planter*



Christina Dvergsnes

Mastergradsoppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2009

Terminalia macroptera

*Immunmodulerende polysakkarider fra Terminalia macroptera
og etnofarmakologisk informasjon om to maliske planter*

Mastergradsoppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo

Christina Dvergsnes

Oslo, mai 2009

Veiledere:

Professor Berit Smestad Paulsen

Professor Drissa Diallo

Forord

Denne mastergradsoppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk kjemi ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo og ved Folkehelseinstituttet. I tillegg ble det utført etnofarmakologiske forsøk i Mali i perioden 26.november – 13. desember 2008.

En stor takk rettes først til min veileder, Professor Berit Smestad Paulsen, for enestående veiledning og inspirasjon under arbeidet med masteroppgaven, samt for å være hyggelig og verdifullt reisefølge i Mali.

Professor Drissa Diallo fortjener en stor takk for tilrettelegging av feltarbeidene i Mali. Det samme fortjener doktor Adiaratou Tologa og N’Golo Balo for deres arbeid som intervjuer og tolk under feltarbeidene.

Stipendiatene Tom Erik Grønhaug, Ingvild Austarheim og Anne Cathrine Vestrheim takkes for god hjelp og praktisk veiledning på laboratoriet. Ingvild takkes også for tiden som reisefølge i Mali

Finn Tønnesen, Parakashtha Ghildyal, Terje Michaelsen og Atle Haugen takkes for tilrettelegging, gjennomføring av diverse tester, og ellers all hjelpsomhet.

Anh Thu Pham takkes for å være et fantastisk reisefølge i Mali, og for å gjøre denne turen uforglemmelig.

Anne Ragnhild Skogly og alle andre medstudenter takkes for praktiske råd, hjelp og inspirasjon under arbeidet med masteroppgaven.

En stor takk rettes til alle ansatte ved Avdeling for Farmasøytisk kjemi ved Farmasøytisk Institutt for å være en utrolig trivelig og hjelpsom avdeling.

Til slutt ønsker jeg å rette en stor takk til venner og familie, og ikke minst til min kjære Tomas, for støtte, tålmodighet og oppmuntring.

Oslo, mai 2009

Christina Dvergsnes

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	5
INNHALDSFORTEGNELSE	7
1. FORKORTELSER.....	13
2. SAMMENDRAG	17
3. INNLEDNING	21
3.1 POLYSAKKARIDER	21
3.2 PLANTENS CELLEVEGG.....	21
3.2.1 Oppbygging og funksjon	21
3.2.2 Cellulose	22
3.2.3 Hemicellulose.....	22
3.2.4 Pektiner.....	22
Arabinaner	23
Arabinogalaktan type I og type II (AG-I og AG-II).....	24
Rhamnogalakturonan I (RG-I).....	24
Rhamnogalakturonan II (RG-II)	24
3.2.5 Struktur og immunmodulerende aktivitet av pektiner	25
3.3 IMMUNMODULERENDE AKTIVITET	26
3.3.1 Immunforsvaret.....	26
B-celler	26
3.3.2 Makrofager og makrofagaktivering	26
3.3.3 Komplementsystemet.....	28
3.4 <i>TERMINALIA MACROPTERA</i> (GUILL. & PERR.)	30
3.4.1 Taksonomisk klassifisering	30
3.4.2 Botanikk og habitat	30

3.4.3	<i>Tradisjonell medisinsk bruk av Terminalia macroptera</i>	32
3.4.4	<i>Tidligere forskning</i>	32
4.	OPPGAVERNS MÅLSETNING	34
5.	METODER OG MATERIALER	35
5.1	GENERELLE METODER	35
5.1.1	Vannkvalitet.....	35
5.1.2	Innveiging.....	35
5.1.3	Filtrering.....	35
5.1.4	Sentrifugering.....	35
5.1.5	Evakuering/fjerning av luft.....	35
5.1.6	Volumreduksjon.....	36
5.1.7	Ultrafiltrering.....	36
5.1.8	Vask av dialyseslanger.....	37
5.1.9	Dialyse	38
5.1.10	Blanding av løsninger	39
5.1.11	Frysetørking	39
5.1.12	Syrevask av utstyr.....	40
5.1.13	Absorbansmåling.....	41
5.1.14	pH-måling	41
5.2	ISOLERING AV POLYSAKKARIDER	41
5.2.1	Ekstraksjon med organiske løsemidler.....	41
5.2.2	Ekstraksjon med 50% etanol	42
5.2.3	Ekstraksjon med vann.....	42
5.2.4	Ionebytterkromatografi	44

ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)	44
5.2.5 <i>Gelfiltrering</i>	47
Bio-Gel P-30.....	47
5.3 KVALITATIV OG KVANTIATIV BESTEMMELSE AV KARBOHYDRATINNHold	48
5.3.1 <i>Fenolsvovelsyretesten</i>	48
5.3.2 <i>Monosakkaridbestemmeselse</i>	50
Metanolyse	50
TMS-derivatisering.....	51
Gasskromatografi.....	52
5.3.3 <i>FPLC - Superdex 200</i>	54
5.3.4 <i>Detektering av ketoser i prøven</i>	57
5.4 STRUKTUROPPKLARING	58
5.4.1 <i>Ezymatisk degradering</i>	58
5.4.2 <i>Metylering</i>	59
Karboksylsyre-reduksjon	59
Metylering	61
Hydrolyse	63
Reduksjon	64
Acetylering	65
5.4.3 <i>GC-MS</i>	66
5.4.4 <i>Identifikasjon av arabinogalaktan II ved hjelp av Yarivreagens</i>	67
5.5 BIOLOGISK AKTIVITET	70
5.5.1 <i>Komplementfikseringstest</i>	70
5.5.2 <i>Måling av NO-frigjøring fra makrofager</i>	73
5.5.3 <i>Indusering av B-celle proliferasjon</i>	74

5.5.4	<i>Modning av dendritiske celler</i>	74
6.	RESULTATER OG DISKUSJON	76
6.1	ISOLERING AV POLYSAKKARIDER	76
6.1.1	<i>Ekstraksjon</i>	77
6.1.2	<i>Ionebytterkromatografi – ANX Sepharose 4 fast flow</i>	77
6.2	STRUKTUROPPLARING.....	78
6.2.1	<i>Monosakkaridanalyse</i>	78
6.2.2	<i>Bindingsforhold</i>	81
	Arabinogalaktan type I (AG-I)	83
	Arabinogalaktan type II (AG-II)	83
	Rhamnogalakturonan I (RG-I)	84
	Rhamnogalakturonan II (RG-II).....	84
6.2.3	<i>Molekylvektsdistribusjon</i>	84
6.2.4	<i>Innhold av ketoser i prøven</i>	88
6.2.5	<i>Identifikasjon av arabinogalaktan II ved hjelp av Yarivreagens</i>	88
6.3	BIOLOGISK AKTIVITET	89
6.3.1	<i>Komplementfikseringstest</i>	89
6.3.2	<i>Indusering av B-celleproliferasjon</i>	92
6.3.3	<i>NO-frigjøring fra makrofager</i>	95
6.4	STRUKTUROPPLARING ETTER ENZYMATISK DEGRADERING MED ENDO-POLYGALAKTURONANASE	96
6.4.1	<i>Gelfiltrering Bio-Gel P-30</i>	96
6.4.2	<i>Monosakkaridanalyse</i>	97
6.4.3	<i>Komplementfikseringstesten</i>	98
6.5	VIDERE STUDIER	99

7.	ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER I MALI	100
7.1	ETNOFARMAKOLOGI	100
7.2	MALI.....	101
7.3	TRADISJONELL MEDISIN I MALI.....	102
7.4	FELTARBEID	102
7.4.1	<i>Intervjuer i Sibyområdet</i>	<i>103</i>
	Parkia biglobosa	103
	Terminalia macroptera	103
7.4.2	<i>Intervjuer i Bandiagaraområdet</i>	<i>116</i>
	Parkia biglobosa	116
	Terminalia macroptera	116
7.4.3	<i>Intervjuer i Dioïlaområdet</i>	<i>121</i>
	Parkia biglobosa	121
	Terminalia macroptera	121
7.5	OPPSUMMERING AV RESULTATER FRA HEALERINTERVJUENE.....	137
7.5.1	<i>Parkia biglobosa.....</i>	<i>137</i>
7.5.2	<i>Terminalia macroptera</i>	<i>138</i>
8.	KONKLUSJON	140
9.	REFERANSER.....	142

1. FORKORTELSER

α	Alfaanomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 har samme konfigurasjon som sukkeret selv (D eller L)
Ac	Acetyl
AcOAc	Eddiksyreanhydrid
AG-I	Arabinogalaktan type I
AG-II	Arabinogalaktan type II
AgNO ₃	Sølvnitrat
ANX	Dietylaminopropyl
Ara	Arabinose
AUC	Arealet under kurven
β	Betaanomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 har motsatt konfigurasjon av selve sukkeret (D eller L)
BSA	Bovine Serume Albumine, bestanddel i Veronal/BSA-buffer
C1-C6	Karbonatomene i et monosakkarid
C3a	Fragment av komplementfragment C3
C3b	Fragment av komplementfragment C3
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate
COOH	Syregruppe
D	D-sukker med hydroksylgruppe i kiralt karbon rettet mot høyre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
D	Diameter
Da	Dalton
DHA	3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid
DMSO	Dimetylsulfoksid
DMT	Département de Médecines Traditionnelles
<i>f</i>	Furanoseform, femring
FHI	Nasjonalt Folkehelseinstitutt
FI	Farmasøytisk institutt
FID	Flammeionisasjonsdetektor
FPLC	Fast protein liquid chromatography
Gal	Galaktose

GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi-massespektrometri
GFI	Gjennomsnittelig fluorescensintensitet
Glc	Glukose
H	Høyde
H ₂	Hydrogengass
HCl	Hydrogenklorid
HMDS	Heksametyldisilazan
IC ₅₀	Konsentrasjon som gir 50 % hemming
kDa	Kilodalton
KDO	2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid
L	L-sukker med hydroksygruppe i kiralt karbon rettet mot venstre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
LPS	Lipopolysakkarid
Me	Metyl
MES	2-[N-morpholino]etan svovelsyre
M _w	Molekylvekt
MWCO	Molecular weight cut off
NaBD ₄	Natriumbordeuterid
NaCl	Natriumklorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroksid
NK-celler	”Natural killer”-celler
NO	Nitrogenoksid
O ₂	Oksyngengass
OH	Hydroksylgruppe
<i>p</i>	Pyranoseform, seksring
PM II	<i>Plantago Major</i> L, fraksjon II
RG-I	Rhamnogalakturonan I
RG-II	Rhamnogalakturonan II
Rpm	Runder per minutt
SRBC	Sensitiviserte røde blodceller fra sau
T	Terminal

TFA	Trifluoreddiksyre
TMERÅ	Råekstrakt etter ekstraksjon med 50 % etanol
TM50WRÅ	Råekstrakt etter ekstraksjon med 50 °C vann
TM100WRÅ	Råekstrakt etter ekstraksjon med 100 °C vann
TMEN,	Nøytral fraksjon isolert fra 50 % etanolekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med vann
TM50WN,	Nøytral fraksjon isolert fra 50 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med vann
TM100WN	Nøytral fraksjon isolert fra 100 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med vann
TMES1	Sur fraksjon isolert fra 50 % etanolekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
TM50WS1	Sur fraksjon isolert fra 50 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
TM50WS2	Sur fraksjon isolert fra 50 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
TM100WS1	Sur fraksjon isolert fra 100 °C vannekstrakt etter eluering på ionebytterkolonne ANX Sepharose 4 Fast Flow med NaCl-gradient
TM50WS1Gall	Enzymgradert fraksjon isolert fra TM50WS1 etter eluering på gelfiltreringskolonne Bio-Gel P-30
TM100WS1Gall	Enzymgradert fraksjon isolert fra TM100WS1 etter eluering på gelfiltreringskolonne Bio-Gel P-30
TMCS	Trimetyklorsilan
TMS	TMCS + HMDS + Pyridin
V0	Voidvolum, mobilfasens elueringsvolum i en kromatografisk kolonne
WHO	World Health Organization

2. SAMMENDRAG

Tradisjonell medisin er en svært viktig del av helsetilbudet i Mali og mange andre land verden over. Tradisjonelle healere innehar stor kunnskap om bruk av tradisjonell medisin, som er tillært og nedarvet fra generasjon til generasjon. *Terminalia macroptera* (Guil. & Perr.) har tradisjonelt blitt brukt til behandling av blant annet indre og ytre sår, hoste og soppinfeksjoner. Polysakkarider fra planter har i studier vist immunmodulerende effekt i biologiske systemer. Det var derfor interessant å teste den biologiske aktiviteten til polysakkarider fra *Terminalia macroptera* (Guil. & Perr.)

Tørkede pulveriserte blader fra *Terminalia macroptera* (Guil. & Perr.) ble ekstrahert med organiske løsemidler for å fjerne lavmolekylære og upolare forbindelser. Plantematerialet ble ekstrahert med 50 % etanol for å fjerne lavmolekylære forbindelser som er litt vannløselige, og råkstraktet TMERÅ forelå. Ved vannekstraksjon ved 50 °C og 100 °C ble polysakkarider isolert i råkstraktene TM50WRÅ og TM100WRÅ. Råkstraktene ble rensset opp ved hjelp av ionebytterkromatografi til de nøytrale fraksjonene TMEN, TM50WN, TM100WN og de sure fraksjonene TMES1, TM50WS1, TM0WS2 og TM100WS1. TM50WS1 og TM100WS1 ble enzymatisk degradert med endo-polygalakturonanase og etterfølgende separasjon ved hjelp av Bio-gel P-30 gav fraksjonene TM50WS1GalI og TM100WS1GalI.

Monosakkaridsammensetningen ble bestemt etter metanolyse, etterfulgt av TMS-derivatisering og GC-analyse. Bindingsforhold ble bestemt etter karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS analyse. Molekylvektsdistribusjonen ble bestemt ved FPLC. Den biologiske aktiviteten ble testet ved hjelp av komplementfikseringstesten, indusering av B-celleproliferasjon og måling av NO-frigjøring fra makrofager.

Nesten alle fraksjonene inneholder arabinose, rhamnose, galaktose og galakturonsyre, som er monosakkarider man finner mye av i pektintype polysakkarider. TM100WN skiller seg ut, denne fraksjonen inneholder verken rhamnose eller galakturonsyre.

Nærmere undersøkelse av bindingsforholdene i råkstraktene, og fraksjonene som har blitt rensset opp ved hjelp av ionebytterkromatografi, indikerte tilstedeværelse av forskjellige pektinstrukturer. De undersøkte fraksjonene inneholdt en stor andel terminalt bundet sukker,

noe som indikerer en høy andel forgrenede pektiner. Alle fraksjonene, utenom TM100WN inneholder 1→4 og/eller 1→3,4,6 bundet galaktose, som indikerer at disse fraksjonene inneholder arabinogalaktan type I. (AG-I)

1→3, 1→6 og 1→3,6 bundet galaktose indikerer innhold av arabinogalaktan type II (AG-II) i prøvene. Alle fraksjonene utenom TM100N inneholder disse bindingstypene. TM100RÅ inneholder bare spor av disse bindingstypene. Innholdet av AG-II i TM50WS1 og TM100WS1 har blitt bekreftet i Yariv-testen. Ut fra bindingsanalysen og Yariv-testen ser TM50WS1 ut til å være fraksjonen med størst andel AG-II.

TMEN, TMES1, TM50WRÅ, TM50WS1, TM50WS2, TM100WRÅ og TM100WS1 inneholder både 1→2 bundet rhamnose og 1→4 bundet galakturonsyre, som er bestanddeler i hovedkjeden til rhamnogalakturonan I (RG-I). Etter enzymatisk degradering er andelene rhamnose og galakturonsyre i de enkelte fraksjonene, TM50WS1GalI og TM100WS1GalI, tilnærmet like store. Dette kan tyde på at det er blitt isolert områder med rhamnogalakturonan I, hvor hovedkjeden består av alternerende α -1→2-L-rhamnose og α -1→4-D-galakturonsyreenheter.

Molekylvekstdistribusjonen til TM50WS1, TM50WS1GalI, TM100WS1 og TM100WS1GalI er polydispers.

Alle rækstraktene, samt TMEN og TMES1 har vist større aktivitet enn den positive kontrollen PM II i to gjennomføringer av komplementfikseringstesten. I tillegg har TM50WN, TM50WS1, TM100N og TM100WS1 vist større aktivitet enn PM-II i en gjennomføring av komplementfikseringstesten. Enzymdegradering av TM100WS1 til TM100WS1GalI øker aktiviteten i komplementfikseringstesten, mens enzymdegradering av TM50WS1 til TM50WS1GalI gir tilnærmet lik aktivitet.

Alle rækstraktene og fraksjonene som har blitt rensset opp ved hjelp av ionebytterkromatografi viser større evne enn medium til å indusere B-celleproliferasjon. TMERÅ, viser den aller største evnen til å indusere B-celleproliferasjon, etterfulgt av TMES1, TM100WS1, TM100WN og TMEN, som alle viser større evne enn de positive kontrollene, LPS og PMII, til å indusere B-celleproliferasjon.

TM100WS1, TM100WN, og TMES1 stimulerer makrofager til å frigjøre mer NO. Denne responsen er doseavhengig. 100µg/ml og 10 µg/ml TM100WS1 stimulerer til størst

frigjøringen av NO, en frigjøring som er større enn det 100µg/ml av de positive kontrollene stimulerer til.

78 tradisjonelle medisinmenn i Siby-, Bandiagara- og Dioïlaområdet ble intervjuet om bruken av *Parkia biglobosa* og *Terminalia macroptera*. 74 healere brukte *Parkia biglobosa* i sin praksis. De hyppigste indikasjonene var diverse sår, diverse smerter og migrene/hodepine. 67 healere brukte *Terminalia macroptera* i sin praksis. De hyppigst nevnte indikasjonene var diverse sår, hoste og diverse smerte.

3. INNLEDNING

3.1 Polysakkarider

Ett polysakkarid består av over 10 monosakkaridenheter som er bundet sammen med glykosidbindinger. Det finnes uendelig mange forskjellige polysakkarider, da antall monosakkaridenheter, og hvilke posisjoner disse er bundet sammen i, kan variere. Dette gir muligheter for rette kjeder, og mer forgrenede områder. Polysakkarider kan deles inn to hovedklasser, homopolysakkarider og heteropolysakkarider. Homopolysakkaridene består av kun en type monosakkaridenheter, mens heteropolysakkarider består av to eller flere typer monosakkaridenheter. Polysakkarider er polymere med høy molekylær vekt. Noen hundre tusen monosakkaridenheter kan være bundet sammen i ett polysakkarid. Løseligheten til et polysakkarid vil påvirkes av den kjemiske sammensetningen, molekylstrukturen og vekten. Polysakkarider har flere viktige oppgaver. De er energilagre og strukturenheter i nesten alle høyere planter. I alger bidrar polysakkarider til å lage gelstrukturer. Man finner også polysakkarider i celleveggen til mange planter. (Izydorczyk 2005)

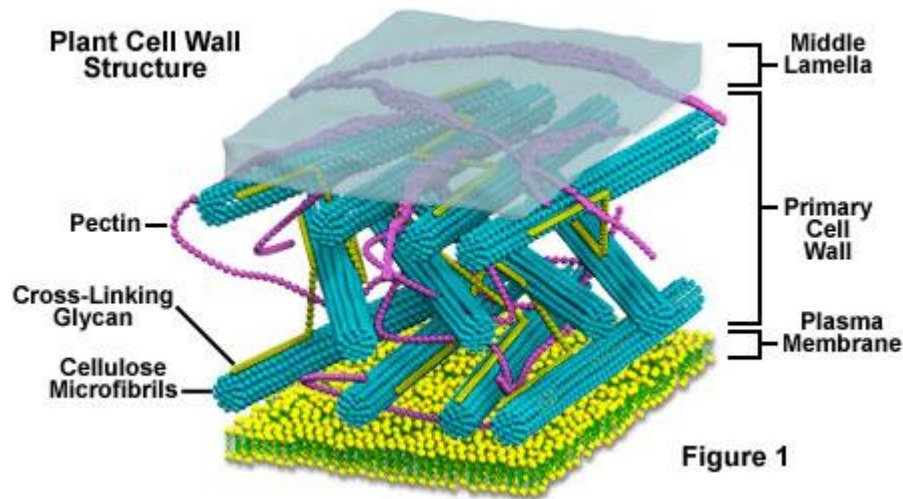
3.2 Plantens cellevegg

3.2.1 Oppbygging og funksjon

Planteceller er, i motsetning til dyreceller, omsluttet av en tynn, men mekanisk sterk cellevegg. Denne celleveggen består av kompleks blanding polysakkarider og andre polymere, organisert i et komplisert nettverk. Plantecelleveggen inneholder også strukturelle proteiner, enzymer, fenoliske polymere, og andre materialer som modifiserer planteveggens fysiske og kjemiske egenskaper. Plantecelleveggen har flere funksjoner. Den sørger blant annet for den mekaniske styrken til plantene, og limer plantecellene sammen. (Taiz og Zeiger 2006)

Plantecelleveggen er bygd opp av tre komponenter, en midtlamella, en primær cellevegg, og i de fleste celler, en sekundær cellevegg, se figur 3.1. Midtlamellaen sitter mellom de primære celleveggene, og er et tynt lag pektinrikt materiale. Den primære celleveggen dannes i voksende celler. Hovedkomponentene er polysakkarider, i form av cellulose, hemicellulose og pektiner. Den sekundære celleveggen dannes først når plantecellen har

sluttet å vokse. Strukturen er ulik den til den primære celleveggen, og består av en større andel cellulose og andre typer hemicelluloser. Veggen er tykk, og bygd opp av flere lag. (Taiz og Zeiger 2006)



Figur 3.1 Plantecelleveggstruktur (Molecularexpressions 2005)

3.2.2 Cellulose

En uforgrenet homopolysakkaridkjede bestående av D-glukosemolekyler bundet sammen med $\beta 1 \rightarrow 4$ glykosidbindinger kalles cellulose. Cellulose er den viktigste bestanddelen i celleveggen. Flere lag med cellulosemolekyler som holdes sammen med hydrogenbindinger og van der Waals krefter danner en micelle. Disse danner igjen microfibriller, som bidrar til cellens rigiditet og styrke. (Nelson og Cox 2004; Samuelsson 2004)

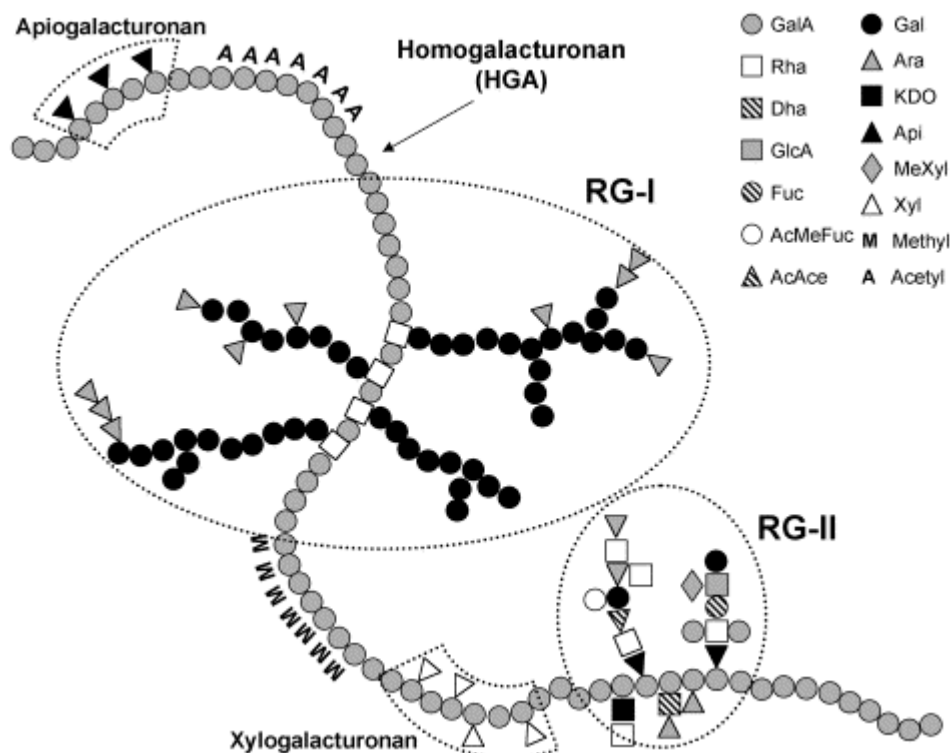
3.2.3 Hemicellulose

Hemicelluloser er en heterogen gruppe polysakkarider, som er sterkt bundet i celleveggen. Det finnes flere typer hemicelluloser i plantecellevegger. Vegger fra forskjellige typer vev og arter har varierende hemicelluloseinnhold. Hemicellulose går også under navnet kryssbindende glykaner. Dette fordi de er fleksible polysakkarider som kan binde seg til celluloseoverflaten og binde microfibrillene sammen i et nettverk. Xyloglukan er den vanligste hemicellulosen. (Taiz og Zeiger 2006)

3.2.4 Pektiner

Pektiner er, i likhet med hemicellulose, en heterogen gruppe polysakkarider. De inneholder sure og nøytrale polysakkarider, noe som fører til god vannløselighet. Hovedkjeden består av

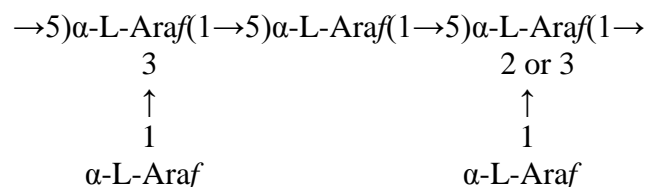
glatte områder med α -1 \rightarrow 4-D-galakturonan-hovedkjede, og hårete områder med rhamnogalakturonan hovedkjede. I de hårete områdene er det bundet sidekjeder som er rike på nøytrale sukker. Det være seg arabinogalaktan, arabinan, galaktooligosakkarider eller arabinooligosakkarider. Noen aktive pektiner inneholder også små områder med RG-II. (Taiz og Zeiger 2006) Figur 3.2 viser en skjematisk presentasjon av primære pektinstrukturer.



Figur 3.2 Skjematisk presentasjon av primære pektinstrukturer (Pérez et al. 2003)

Arabinaner

Arabinaner består av L-arabinofuranosider, som er bundet sammen i lineære eller forgrenede kjeder, avhengig av kilde. L-arabinofuranosidene i hovedkjeden er bundet sammen med α -1 \rightarrow 5 bindinger. Forgreningene er i hovedsak i C3-posisjon, men forekommer også i C2-posisjon. Se figur 3.3. Høyst sannsynlig foreligger ikke arabinaner fritt i naturen, men bundet til galaktanenheter i pektinkomplekser. Disse frigjøres ved enzymatisk aktivitet eller svak syrehydrolyse i løpet av ekstraksjonsprosessen. (Paulsen og Barsett 2005)



Figur 3.3 Foreslått struktur av en del av et arabinan (Paulsen og Barsett 2005)

Arabinogalaktan type I og type II (AG-I og AG-II)

Arabinogalaktaner blir klassifisert i tre grupper: arabino-4-galaktaner (type I), arabino-3,6-galaktaner (type II) og polysakkarider med sidekjeder av arabinogalaktan (type III).

Sistnevnte kalles ofte ekte pektin og er nærmere behandlet i avsnittene om RG-I og RG-II.

AG-I finnes i variable mengder i celleveggen og er bygget opp av en hovedkjede bestående av β -1 \rightarrow 4-bundet galaktan, med sidekjeder av arabinan som er bundet gjennom C3-posisjon i galaktoseenhetene. AG-II har en hovedkjede av galaktan bundet sammen i enten C3- eller C6-posisjon. De høyst frekvente forgreningene består av 1 \rightarrow 3,6-bundede galaktoseenheter. Både AG-I og AG-II finnes som strukturenhet i RG-I, bundet til pektinkjeden via C4-posisjonen i rhamnosenheten. For å skille mellom de to strukturelementene kan man utføre en såkalt Yariv-test. Bare AG-II har muligheten til å forme et rødt bunnfall samme med Yariv-reagens, mens AG-I forblir i løsning. (Paulsen og Barsett 2005) De fleste antikomplementære arabinogalaktaner har blitt karakterisert som AG-II (Yamada og Kiyohara 1999)

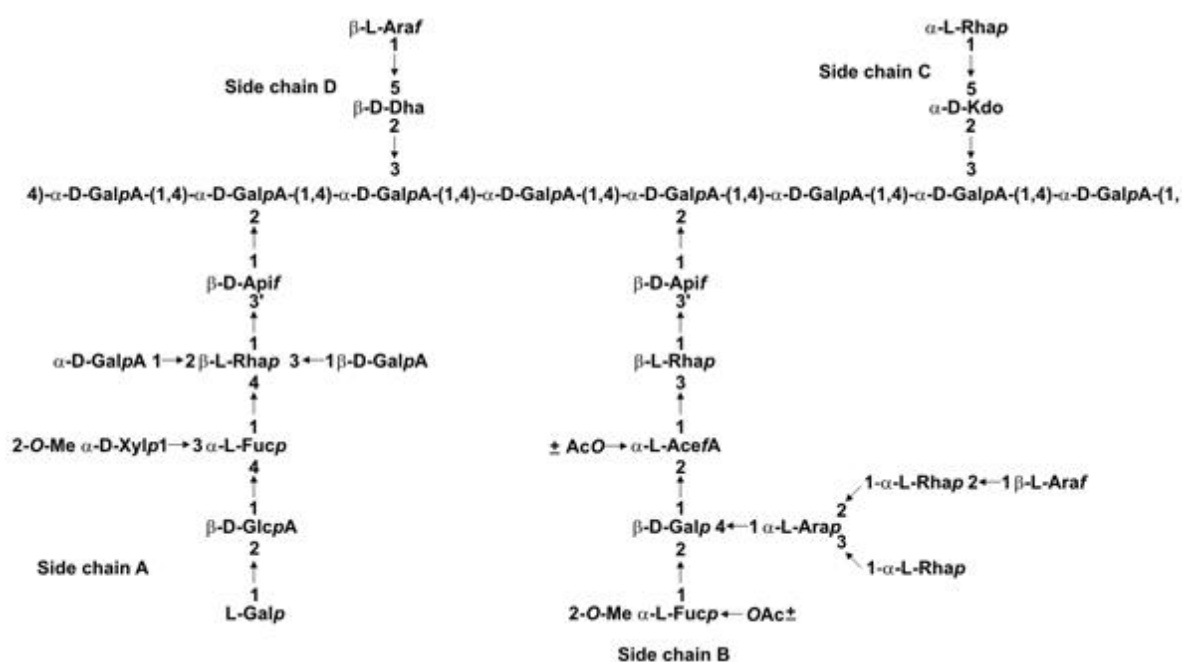
Rhamnogalakturonan I (RG-I)

RG-I består av en hovedkjede med alternerende α -1 \rightarrow 2-L-rhamnose og α -1 \rightarrow 4-D-galakturonsyreenheter. Rhamnosenhetene er forgreningspunkter i hovedkjeden, primært i C4-posisjon, men og i C3-posisjon. Sidekjedene består av arabinan og galaktan i forskjellige strukturer. Arabinogalaktaner som er bundet til rhamnosenheten viser seg ofte å være AG-II, men AG-I er også til stede av og til. Disse områdene kalles ofte "hairy" eller "rhamified regions", i motsetning til de glatte områdene som består av en hovedkjede med α -1 \rightarrow 4-galakturonsyreenheter. Galakturonsyreenhetene kan være acetylt eller metylert i C2- og/eller C3-posisjon. (Paulsen og Barsett 2005)

Rhamnogalakturonan II (RG-II)

RG-II er en kompleks struktur som finnes i den primære celleveggen hos de fleste planter. Den omfatter bare en liten del av den totale mengden pektiner representert i

plantecelleveggen. Hovedkjeden består ikke av rhamnogalakturenan som navnet tilsier, da den ble navngitt før strukturen ble oppklart. 9-10 α -1 \rightarrow 4-D-galakturensyreenheter utgjør hovedkjeden, med fire forskjellige oligosakkaridsidekjeder bundet via C3-eller C4-posisjon. I disse sidekjedene finnes en rekke sjeldne sukker, som 2-O-metylfucose, 2-O-metylfucose, apiose, aceric acid, 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO) og 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid (DHA). (Paulsen og Barsett 2005) Figur 3.4 viser en foreslått struktur til RG-II. RG-II enhetene er kryssbundet i plantecelleveggen av boratdiester. Denne bindingen er viktig for strukturen og den mekaniske styrken til celleveggen. (Taiz og Zeiger 2006)



Figur 3.4 Foreslått struktur av RG II
(Complex_Carbohydrate_Research_Center)

3.2.5 Struktur og immunmodulerende aktivitet av pektiner

Innenfor tradisjonell medisin har planter blitt brukt til å behandle forskjellige typer sykdommer og sår. Nyere forskning har vist at mange av disse plantene inneholder polysakkarider med forskjellige biologiske aktiviteter. Polysakkarider av typen arabinaner, arabinogalaktaner og rhamnogalakturenaner har vist seg å ha effekt på komplementsystemet. Lignende typer polysakkarider har også vist seg å ha effekt på makrofager, T-lymfocytter, og NK-celler. Mange av disse polysakkaridene har evnen til å binde seg til overflaten av celler, og kan dermed bidra til lokale effekter. (Paulsen og Barsett 2005)

3.3 Immunmodulerende aktivitet

3.3.1 Immunforsvaret

Det humane immunforsvaret består av to deler, det ytre og det indre forsvaret. Det ytre forsvaret består av hud, slimhinner og andre organer som beskytter menneskekroppen slik at patogene mikroorganismer ikke kommer inn. Det indre forsvaret kan igjen deles inn i to deler, det medfødte og det ervervede immunforsvaret.

Når en patogen mikrobe først har forsert det ytre immunforsvaret, setter det indre immunforsvaret i gang arbeidet med å drepe og eliminere denne mikroorganismen. Det medfødte immunforsvaret er det første som trer i funksjon. Deretter kommer det ervervede immunsystemet på banen dersom de medfødte immunmekanismene ikke greier å forsvare kroppen godt nok. (Sand et al. 2001)

B-celler

B-celler hører til i kategorien små lymfocytter, sammen med T-celler. De stammer fra lymfoide forløpere i benmarg, hvor B-cellene også modnes. På celleoverflaten bærer hver B-celle overflatereseptorer som kalles immunoglobuliner. Når immunoglobulinene på B-cellen matcher antigen som blir detektert i kroppen, begynner B-cellene med denne typen immunoglobuliner å proliferere. Dattercellene differensierer til plasmaceller og hukommelsesceller. Plasmacellene skiller ut frie antistoffer som er identiske med de reseptorene på B-cellene som gjenkjente og bandt antigenet. Hukommelsescellene ”husker” det fremmede antigenet, og neste gang det kommer inn i kroppen vil hukommelsescellen raskt sette i gang en storstilt produksjon av antistoffer. (Sand et al. 2001; Parham 2005)

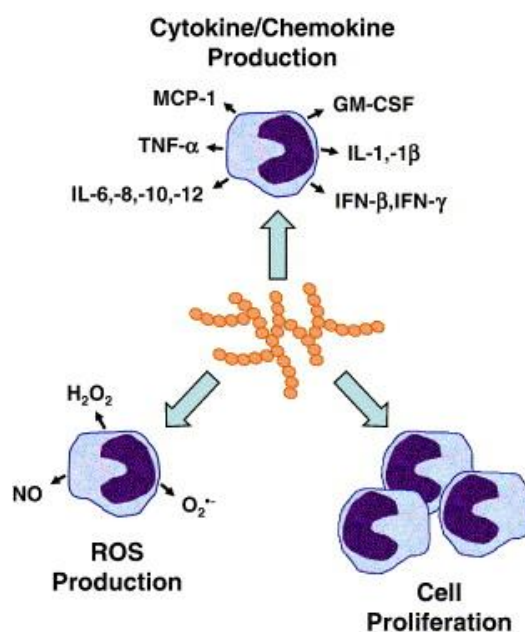
3.3.2 Makrofager og makrofagaktivering

Makrofager er spesialiserte hvite blodceller som finnes i store mengder i vev og lymfeknuter, og utgjør en viktig del av det medfødte immunforsvaret. Makrofagene sirkulerer først som monocytter i blodstrømmen før de slår seg ned i vev og modnes til makrofager. En av oppgavene til makrofagene er å fange opp og degraderer patogener som kommer til lymfen fra infeksjonsstedet. Dette gjør at makrofager kan presentere antigen fra patogener for T-celler, og forhindre at infeksjoner når blodet og blir systemiske. I tillegg til å fagocyttere har altså makrofagene også en funksjon i det ervervede immunforsvaret som en antigenpresenterende celle. Når en makrofag presenterer et antigen for en naiv T-celle

modnes den til en T_H-celle. Dette fører til frigjøring av cytokiner som blant annet stimulerer makrofager til økt fagocytose og fremmer inflammatorisk respons.(Parham 2005)

Makrofager er i tillegg involvert i prosesser som vevsremodellering, sårtilheling og hematopoese.(Schepetkin og Quinn 2006)

Plantederiverte polysakkarider har vist seg å utøve en rekke fordelaktige farmakologiske effekter via sine evner til å modulere immunfunksjonene til makrofagene. Se figur 3.5.



Figur 3.5 Plantepolysakkarider aktiverer en mengde makrofagresponser. Forkortelser: IL, interleukin; IFN, interferon; TNF- α , tumor nekrosefaktor α ; GM-CSF, granulocyt/makrofag koloni-stimulerende faktor; MCP-1, monocyt kjemoattraktant protein-1; NO, nitrogenoksid. (Schepetkin og Quinn 2006)

Med bakgrunn i flere studier gjort på polysakkarider fra høyere planter, har man sett at polysakkarider kan ha modulerende effekt på makrofagaktiveringen. Polysakkaridene øker makrofagenes cytotoksiske aktivitet mot tumorceller og mikroorganismer, aktiverer fagocytosevirksomheten, øker produksjonen av reaktive oksygenspesier (ROS) og nitrogenoksid (NO), og øker sekresjonen av cytokiner og kjemokiner, som tumor nekrosefaktor (TNF- α), og diverse interleukiner.

3.3.3 Komplementsystemet

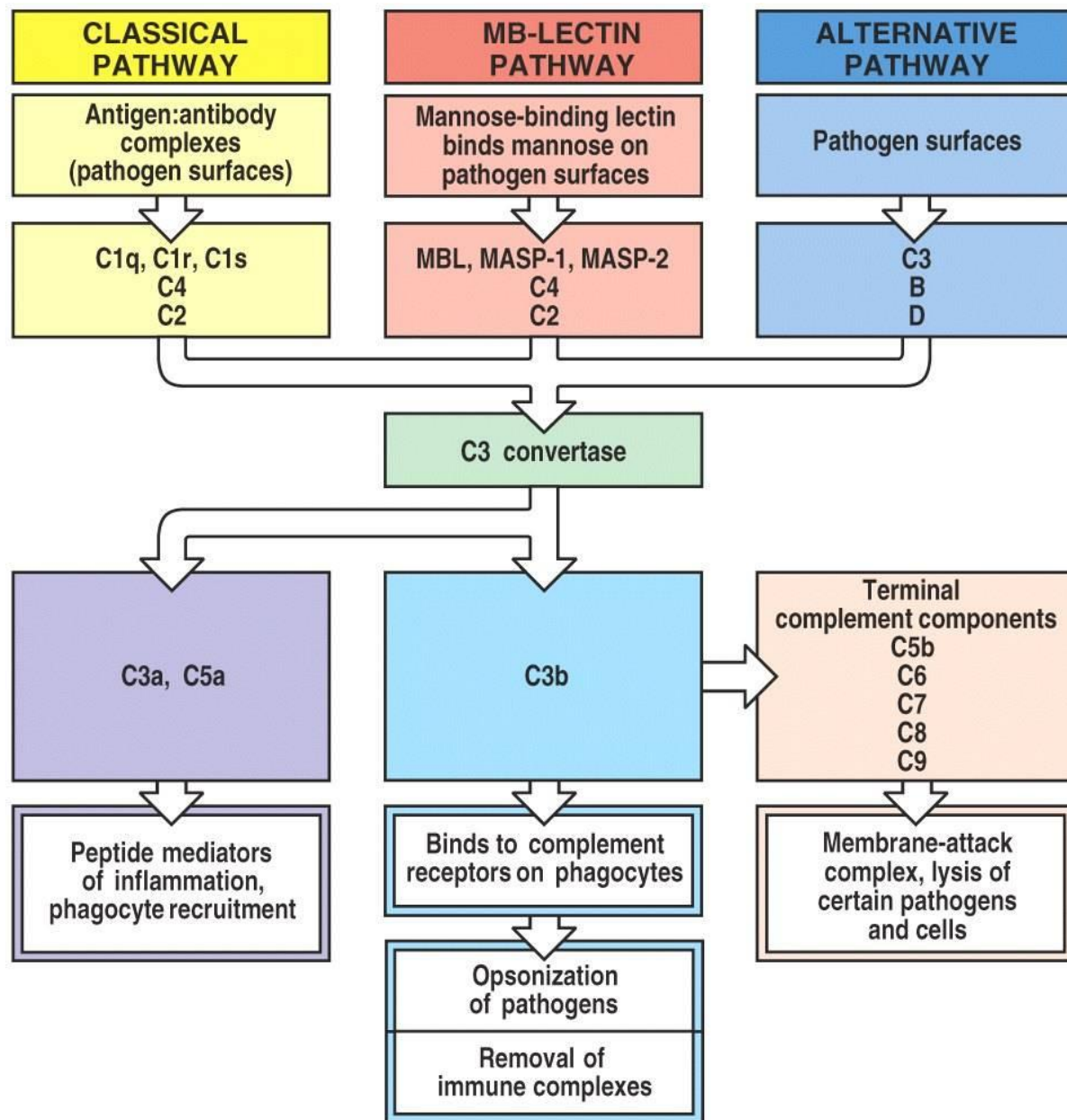


Figure 2-19 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Figur 3.6 Aktivering av komplementsystemet (Garland_Science 2005)

Komplementsystemet er et system som består av over 30 blodproteiner. Når dette systemet aktiveres, settes det i gang en kaskade av enzymatiske reaksjoner. Protolytisk kløyving og aktivering av bestemte komponenter i komplementsystemet fører til kovalent binding av spesielle komplementfragmenter til overflaten av et patogen. Fagocytter kan kjenne igjen fragmentene via spesielle reseptorer på celleoverflaten. Ved gjenkjennelsen av slike fragmenter blir de komplementdekkede mikrobene tatt opp og destruert av neutrofile granulocytter og makrofager. (Parham 2005)

Komplement aktiveres på tre forskjellige måter, klassisk, alternativ og mannosebindende lektin vei for aktivering av komplement. Se figur 3.6. Den klassiske aktiveringsveien krever binding av antistoff til spesifikke antigen på patogenets overflate for å bli aktivert. Når mannosebindende lektin binder seg til patogenets overflate vil komplement bli aktivert via mannosebindende lektin vei. Patogenene kan også påvirke det lokale miljøet, og på denne måten aktivere komplement via den alternative aktiveringsveien. (Parham 2005)

Alle tre aktiveringsveiene fører til samme reaksjon. Komplementkomponent C3 blir delt i to fragmenter C3a og C3b. C3b binder seg kovalent til overflaten av patogenet. Det er denne bindingen som kalles komplementfiksering. Denne merkingen av patogenet gjør fagocytosen lettere. C3a-fragmentet har som oppgave å rekruttere inflammatoriske celler til infeksjonsstedet. (Parham 2005)

3.4 *Terminalia macroptera* (Guill. & Perr.)

3.4.1 Taksonomisk klassifisering

(ALUKA 2009; USDA 2009)

Rike:	Plantae (planteriket)
Subrike:	Tracheobionta (vaskulære planter)
Superdivisjon:	Spermatophyta (frøplanter)
Divisjon:	Magnoliophyta (Angiospermae, blomstrende planter)
Klasse:	Magnoliopsida
Orden:	Myrtales
Familie:	Combretaceae
Slekt:	<i>Terminalia</i>
Art:	<i>Terminalia macroptera</i> (Guill. & Perr.)

3.4.2 Botanikk og habitat

Terminalia macroptera (Guill. & Perr.) er et tre som kan bli opp til 20 meter høyt. Barken er brunsort, med store furer. Under barken er stammen glatt og gråbrun. Bladene er mellom 15 og 35 cm lange, 6-16 cm brede og har en smal egg- eller elipseform. Treet har små gulhvite blomster, og avlang, glatt, flat frukt med et frø i midten. Treet trives på savannen i tørr leirejord i lavlandet. I Vest-Afrika er *Terminalia macroptera* et ganske vanlig tre, og det vokser hele veien fra Senegal i vest, til Kamerun, og helt til Sudan i øst.(Arbonnier 2004)
Figur 3.6 og 3.7 viser bilder av bladene til *Terminalia macroptera*



Figur 3.7 Herbarieeksemplar av Terminalia macroptera med blader og blomster



Figur 3.8 Blad fra Terminalia macroptera

3.4.3 Tradisjonell medisinsk bruk av *Terminalia macroptera*

Terminalia macroptera har tradisjonelt blitt tilskrevet en antimikrobiell effekt, og har på grunn av dette hatt en bredt bruksområde.

I Mali brukes dekokt av *Terminalia macroptera* og *Angeissus leiocarpa* til å farge bomullstøy gult eller okergult. Dette bomullstøyet skal ha en antimikrobiell effekt, og brukes til å kle gutter og jenter som akkurat har blitt omskåret, for å unngå infeksjon. (Jansen og Cardon 2005)

I Guinea Bissau har *Terminalia macroptera* tradisjonelt blitt brukt mot malaria. Det er først og fremst rotbarken som blir brukt som dekokt, både som drikke, og til å bade i. (Sanon et al. 2003)

Bladene skal ha bevist effekt mot gastritt, kolikk og høyt blodtrykk. Flere andre bruksområder er også nevnt, men disse områdene har det ikke blitt utført noen forskning på. Røttene har blitt brukt som tonic og astringent, diuretisk middel og afrodisiaka. De har og blitt brukt mot slapphet, depresjon, hoste, gulsott, syfilis, stivhet, utflod, proteiner i urinen, urinveisinfeksjon, epilepsi og sterilitet. Rotbarken har blitt nevnt i flere anledninger. Mot sår, slangebitt, konjunktivitt, diaré og dysenteri og hemoroider. Bladene har blitt brukt mot feber, hudlidelser, brennkopper, spedalskhet og tuberkulose. Barken på treet har blitt brukt mot kolikk, tannkjøttbetennelse, og hull i tennene. (Arbonnier 2004)

3.4.4 Tidligere forskning

Det er gjort begrenset med forskning på *Terminalia macroptera*. Denne forskningen har i stor grad konsentrert seg om den antimikrobielle effekten til *Terminalia macroptera*. Noen eksempler er nevnt nedenfor

Både bladene og røttene har blitt testet for aktivitet mot *Neisseria gonorrhoeae*, bakterien som forårsaker kjønnssykdommen gonoré. Forskjellige ekstrakter av bladene ble testet mot forskjellige stammer av *Neisseria gonorrhoeae*, hvor noen var resistente mot penicillin og tetracykliner. Fraksjonen som ble ekstrahert med dietyleter viste den største aktiviteten, også mot de resistente stammene (Silva et al. 2002).

Aktiviteten til roten fra *Terminalia macroptera* mot *Neisseria gonorrhoeae* ble testet sammen med flere andre planter fra Guinea Bissau. Etanolekstraktet fra *Terminalia*

macroptera viste lovende aktivitet, og ble derfor delt opp i flere fraksjoner i håp om å finne større aktivitet. Det viste seg at dette ikke var tilfelle, og at råekstraktet hadde høyest aktivitet. Også her ble det vist god effekt mot penicillin- og tetracyklinresistente stammer av *Neisseria gonorrhoeae*. En sammenligning av de to studiene viste omtrent lik effekt for blad og rot, men det anbefales å bruke blader da disse er lettere tilgjengelig enn rot. (Silva et al. 1997; Silva et al. 2002)

Det er også gjort forsøk på strukturoppklaring av komponenter i etanolekstraktet fra roten og fraksjoner som var aktivt mot *Neisseria gonorrhoeae*. Flere ellagitanniner ble funnet, og fem av dem ble identifisert som terchebulin, punicalagin, gallic acid, ellagic acid og terflavin A. (Silva et al. 2000)

Terminalia macroptera har blitt testet for antiplasmodial effekt mot klorokinresistente stammer av *Plasmodium falciparum*. Vannekstraktet viste størst aktivitet med en IC₅₀-verdi på 1 µg/ml. (Sanon et al. 2003)

4. OPPGAVENS MÅLSETNING

Oppgavens målsetning var todelt:

1. Det skulle utføres studier på polysakkarider fra *Terminalia macroptera*, der polysakkarider skulle isoleres og karakteriseres med hensyn på karbohydratinnhold og struktur. I tillegg skulle biologisk aktivitet studeres og struktur-aktivitetsforhold i biologiske systemer skulle vurderes.
2. Det skulle utføres etnofarmakologiske studier i Mali. Healerintervjuer i ulike områder av landet skulle gjennomføres for å samle informasjon om medisinsk bruk av *Terminalia macroptera*, der hensikten var å få økt kjennskap til den tradisjonelle bruken av planten

5. METODER OG MATERIALER

5.1 Generelle metoder

5.1.1 Vannkvalitet

Alle metoder ble utført med destillert vann, dersom ikke noe annet er spesifisert.

5.1.2 Innveiging

Overskålsvekt: OHAUS Portable Advanced Model No CT1200V

Analysevekt: Sartorius BP 2215, ISO 9001
Mettler Toledo, PB3002

5.1.3 Filtrering

Gasbind

Sikt 0,2 mm

Membranfiltre: Acrodisc[®] 32 mm 0,45 µm Supor[®] membrane (Pall[®])
Acro[®] 50A Filter Device 5 µm Versapor[®] Membrane (Life Sciences, Pall Corporation)
Acrodisc[®] Syringe Filter 0,2 µm Supor[®] membrane, Low Protein Binding, Non-Pyrogenic (Pall[®])

5.1.4 Sentrifugering

Heraeus Multifuge 4 KR Centrifuge (FI)

Heraeus Multifuge 3SR+ Centrifuge (FHI)

5.1.5 Evakuering/fjerning av luft

Luft i løsningene ble fjernet med en av disse metodene:

a) vannstrålevakuum i 15-30 minutter

b) gjennombobling med helium i 10-20 minutter

5.1.6 Volumreduksjon

Prinsipp

Volumet på en løsning reduseres ved hjelp av en rotavapor. Med varme og vakuum kan løsningsmiddelet og andre flyktige forbindelser dampes av, og løsningen oppkonsentreres.

Utstyr

Rotavapor (Büchi R-200) med kjøleoppsats og vakuumpumpe

Pærekolbe

Prosedyre

Løsningene ble dampet inn under vakuum ved ca 40 °C

5.1.7 Ultrafiltrering

Prinsipp

Løsningen pumpes mot filteret. Den lavmolekylære delen (under 5 kDa) passerer gjennom filteret og ut gjennom den ene slangen. Den høymolekylære delen av prøveløsningen resirkuleres. På denne måten kan man både redusere volumet på løsningen, og fjerne lavmolekylære substanser.

Utstyr

Pumpe: Watson Marlow 520s

Filter: Ultrasette™ Omega 5K PALL Corporation suspended screen channel

Erlenmeyerkolber

Slangeklemmer

Reagenser

Destillert vann

0,3 M NaOH (aq) (Prolabo)

0,1 M NaOH (aq) (Prolabo)

Prosedyre

1. Filteret ble vasket med destillert vann over natta
2. Midtre filtratutgang stenges med en slangeklemme
3. Prøveløsningen pumpes gjennom filteret i fem minutter
4. Midtre filtratutgang åpnes forsiktig. Den lavmolekylære delen av løsningen kommer ut her, og samles opp i en egen kolbe.
5. For å oppnå høyt nok trykk over filteret må den høymolekylære utgangen lukkes til med en slangeklemme. Det skal dryppe litt fra denne utgangen. Den høymolekylære løsningen resirkuleres tilbake til prøveløsningen
6. Filtreringen avsluttes når prøveløsningen har fått et passende volum

Vask og oppbevaring av Ultrasette

1. Ultrasetten vaskes først med destillert vann i ca 10 minutter. Vask begge utgangene.
2. Ultrasetten vaskes så med 1 liter 0,3 M NaOH-løsning, eller til det som kommer ut av utgangene ikke lenger er farget. Ingen resirkulering av NaOH-løsningen
3. Ultrasetten vaskes videre med 2 liter 0,3 M NaOH-løsning, men nå resirkuleres denne. Vask i 15 minutter.
4. NaOH-løsningen vaskes bort med destillert vann til det som kommer ut av begge utgangene er nøytralt. (Kontroller med pH-papir)
5. Før oppbevaring pumpes 0,1 M NaOH inn i Ultrasetten og alle inn- og utganger stenges. Ultrasetten oppbevares ved 4 °C

5.1.8 Vask av dialyseslanger

Prinsipp

Dialyseslangene vaskes for å fjerne eventuelle rester av cellulose.

Utstyr

Dialyseslanger: Spectra/Por[®] Dialysis Membrane, MWCO 3,500, d: 29 mm

Stort begerglass

Kokeplate

Hansker

Briller

Reagenser

2 % NaOH (aq) (Prolabo)

0,05 % NaN₃ (aq) (Merck)

Destillert vann

Prosedyre

1. Dialyseslangene klippes opp i ønsket lengde og skylles godt i springvann
2. Slangene kokes 10 minutter i 2 % NaOH-løsning som er oppvarmet på forhånd
3. Etter koking skylles slangene grundig både inn- og utvendig. Først med springvann, og deretter med destillert vann
4. Slangene kokes så i destillert vann i 10 minutter
5. Deretter skylles slangene godt i destillert vann
6. Slangene oppbevares i 0,05 % natriumazidløsning ved 4 °C for å hindre bakterievekst.

5.1.9 Dialyse

Prinsipp

Salter og andre lavmolekylære forbindelser kan fjernes ved dialyse. Porestørrelsen i dialyseslangen bestemmer hvor store molekyler som fjernes. Molekyler som er mindre enn cut-off verdien (MWCO) vil på grunn av osmotiske krefter diffundere ut gjennom porene i dialyseslangen så lenge det er konsentrasjonsforskjeller. For å opprettholde den osmotiske gradienten er det viktig å skifte vann ofte.

Utstyr

Ren bøtte eller stort begerglass

Dialyseslanger: Spectra/Por[®] Dialysis Membrane, MWCO 3,500, d: 29 mm,
vasket etter metode 5.1.8

Magnet og magnetrører
Dialyseklemmer
Glasstaver

Reagenser

Destillert vann
Toluen
Mettet AgNO_3 -løsning

Prosedyre

1. Slangene skylles godt med destillert vann før bruk
2. Dialyseslangen lukkes med en dialyseklemme i den ene enden
3. Litt destillert vann fylles i slangen for å sjekke at den er tett
4. Slangen fylles med prøveløsning, ca 2/3 full
5. 3-4 dråper toluen tilsettes som konserveringsmiddel
6. Luft fjernes fra slangen, før den åpne enden lukkes med en dialyseklemme
7. Slangen ble overført til en ren bøtte fylt med destillert vann.
8. Bøtten ble satt på røring med magnet ved 4 °C. Glasstaver beskytter slangen mot å komme i kontakt med magneten
9. Dialysevannet skiftes ofte. Når ca 2 ml ikke lenger blir blakket av 1 dråpe AgNO_3 -løsning er dialysen ferdig

5.1.10 Blanding av løsninger

Løsninger ble blandet ved hjelp av:

Whirlimixer (Fisons)
MS2 Minishaker (IKA©)

5.1.11 Frysetørring

Prinsipp

Prøver ble tørket ved at vann fjernes fra frosne prøver ved sublimasjon ved hjelp av vakuum

Utstyr

Metanolbad: HETOFRIG (Heto Birkerød, Danmark)

Frysetørker: Christ[®] Alpha I-4

Christ[®] Alpha I-6

Rundkolber til frysetørking utenpå frysetørkeren

Metyleringsrør eller andre beholdere til frysetørking inni frysetørkeren

Prosedyre

1. Prøveløsningen ble dampet inn til ønsket volum ved hjelp av rotavapor
2. Prøveløsningene ble frosset ned, enten på metanolbad ved -40 °C, eller i fryser
3. Rundkolber med glassull i åpningen ble satt utenpå frysetørkeren. Prøver i andre beholdere ble dekket med perforert parafilm og satt inni frysetørkeren oppå en korkring
4. Prøvene ble tatt av frysetørkeren når kolbene hadde nådd romtemperatur.
Normal tørketid var 24-48 timer.

5.1.12 Syrevask av utstyr

Prinsipp

Glassutstyr kan inneholde forurensinger av cellulose som kommer fra papp- eller papiremballasje. Disse må fjernes før glassutstyret skal brukes i karbohydratanalyser. Konsentrert HCl hydrolyserer bindinger i karbohydratforurensinger, og forurensingene kan skylles bort med vann.

Utstyr

Varmeskap

Hansker

Briller

Reagenser

Konsentrert HCl (Merck)
Springvann og destillert vann
Metanol (Merck)

Prosedyre

1. Glassutstyret fylles/dekkes med konsentrert HCl. Henstand 30 minutter
2. Glassutstyret skylles grundig. Første med springvann, deretter med destillert vann
3. Glassutstyret skylles med metanol for hurtigere tørking
4. Glassutstyret tørkes i varmeskap ved 80 °C

5.1.13 Absorbansmåling

Absorbansmålinger ble utført på følgende apparater:

BIO-RAD Modell 3550 Microplate Reader (metode 5.3.1)
Thermomax microplateleser (metode 5.5.1)

5.1.14 pH-måling

pH ble målt med pH-stix

pH-strips: Neutralit[®] pH 1-14 (Merck)

5.2 Isolering av polysakkarider

5.2.1 Ekstraksjon med organiske løsemidler

Prinsipp

Plantematerialet ble ekstrahert med diklormetan og metanol for å fjerne lavmolekylære og upolare forbindelser. Disse forbindelsene kan interferere med polysakkaridanalysene som utføres senere i oppgaven. Diklormetan og metanolekstraksjonen ble utført av Anh Thu Pham som har arbeidet videre med de lavmolekylære ekstaktene.

5.2.2 Ekstraksjon med 50% etanol

Prinsipp

Plantematerialet ble ekstrahert med 50 % etanol. Lavmolekylære forbindelser som er litt vannløselige, og som ikke ble fjernet når det ble ekstrahert med diklormetan og metanol, fjernes nå.

Utstyr

Stor kjele, 8 liter
Kokeplate (Wilfa CP-1)
Røreredskap
Gasbind

Reagenser

50 % etanol

Prosedyre

1. Tørket plantemateriale (677 g) fra metode 5.2.1 ble overført til en stor kjele
2. 5 liter 50 % etanol ble tilsatt
3. Plantematerialet ble ekstrahert ved ca 50 °C i 1 time. Rørte om av og til.
4. Plantematerialet ble filtrert gjennom et gasbind, og vannet klemte ut
5. Punkt 1-4 ble gjentatt
6. Ekstraktene ble samlet og sentrifugert (metode 5.1.4) ved 4000 rpm i 20 minutter for å fjerne eventuelle planterester i ekstraktet
7. Ekstraktet ble redusert og etanolen ble dampet av på rotavapor (metode 5.1.6)
8. Ekstraktet ble dialysert (metode 5.1.9) og frysetørket (metode 5.1.11)

5.2.3 Ekstraksjon med vann

Prinsipp

Plantematerialet ble ekstrahert med vann, både ved 50 °C og 100 °C. Vann er et polart løsningsmiddel som vil løse polare forbindelser i plantematerialet. Polysakkaridenes ulike

grad av løselighet ved forskjellige temperaturer gjør at de to ekstraktene vil få forskjellig polysakkaridsammensetning.

Utstyr

Stor kjele, 8 liter
Kokeplate (Wilfa CP-1)
Røreredskap
Sikteoppsats 0,2 mm

Reagenser

Vann

Prosedyre

1. Plantematerialet fra metode 5.2.2 ble overført til en stor kjele
2. 5 liter vann ble tilsatt
3. Plantematerialet ble ekstrahert ved ca 50 °C i 2 timer
4. Plantematerialet ble filtrert gjennom en sikteoppsats med siktstørrelse 0,2 mm
5. Punkt 1-4 ble gjentatt
6. Ekstraktene ble samlet og sentrifugert (metode 5.1.4) ved 4000 rpm i 20 minutter for å fjerne eventuelle planterester i ekstraktet
7. Ekstraktet ble redusert og lavmolekylære forbindelser ble fjernet ved ultrafiltrering (metode 5.1.7)
8. Ekstraktet ble dialysert (metode 5.1.9)
9. Plantematerialet ble overført til en stor kjele
10. 5 liter vann ble tilsatt
11. Plantematerialet ble ekstrahert ved ca 100 °C i 2 timer
12. Plantematerialet ble filtrert gjennom en sikteoppsats med siktstørrelse 0,2 mm
13. Punkt 9-12 ble gjentatt
14. Ekstraktene ble samlet og sentrifugert (metode 5.1.4) ved 4000 rpm i 20 minutter for å fjerne eventuelle planterester i ekstraktet
15. Ekstraktet ble redusert og lavmolekylære forbindelser ble fjernet med ultrafiltrering (metode 5.1.7)
16. Ekstraktet ble dialysert (metode 5.1.9) og frysetørket (5.1.11)

5.2.4 Ionebytterkromatografi

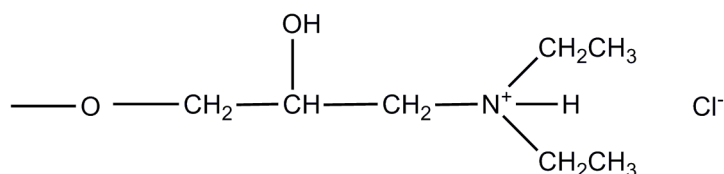
Prinsipp

Ionebytterkromatografi ble benyttet for å rense opp råekstraktene. Ionebyttermaterialet består av en stasjonærfase med positivt eller negativt ladede partikler. Disse kalles henholdsvis for anion- eller kationbyttere. Når en prøve elueres gjennom ionebyttermaterialet vil det oppstå ioniske interaksjoner mellom ladede grupper på analytten og motsatt ladede grupper på sorbenten. I dette tilfelle brukes en svak anionbytter, hvor sorbenten har en positiv ladning. Negativt ladede forbindelser vil dermed retarderes på kolonnen, mens de nøytrale og positive forbindelsene vil komme ut sammen med eluenten. For å separere de negativt ladede forbindelsene som er retardert på kolonnen elueres det med en NaCl-gradient. (Greibrokk et al. 1998)

ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)

ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) er en svak anionbytter basert på sterkt kryssbundet agarose. Den har høy kjemisk og fysisk stabilitet med god separasjonsevne.

Ionebyttergruppen er en dietylaminopropyl-gruppe som har en positiv ladning, med Cl^- som motion, se figur 5.1. (Amersham og Bioscience 2000)



Figur 5.1 Dietylaminopropylgruppen med ett kloridion

Utstyr

Kolonne:	Pharmacia Biotech
Kolonnematriks:	ANX Sepharose 4 Fast Flow (high Sub)
Kolonnevolum:	Ca 240 ml
Pumpe:	SPETEC Biotech
Fraksjonssamler:	Superfrac, Pharmacia LKB
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør RB 15 ml, Heger AS

Filter:	Acro [®] 50A Filter Device, 5 µm Versapor [®] Membrane, Life Sciences
Plastsprøyter:	BD Plastipak [™] , 50 ml

Reagenser

Destillert vann

2 M NaCl (aq) (Prolabo)

1M NaOH (aq) (Prolabo)

AgNO₃ (aq)

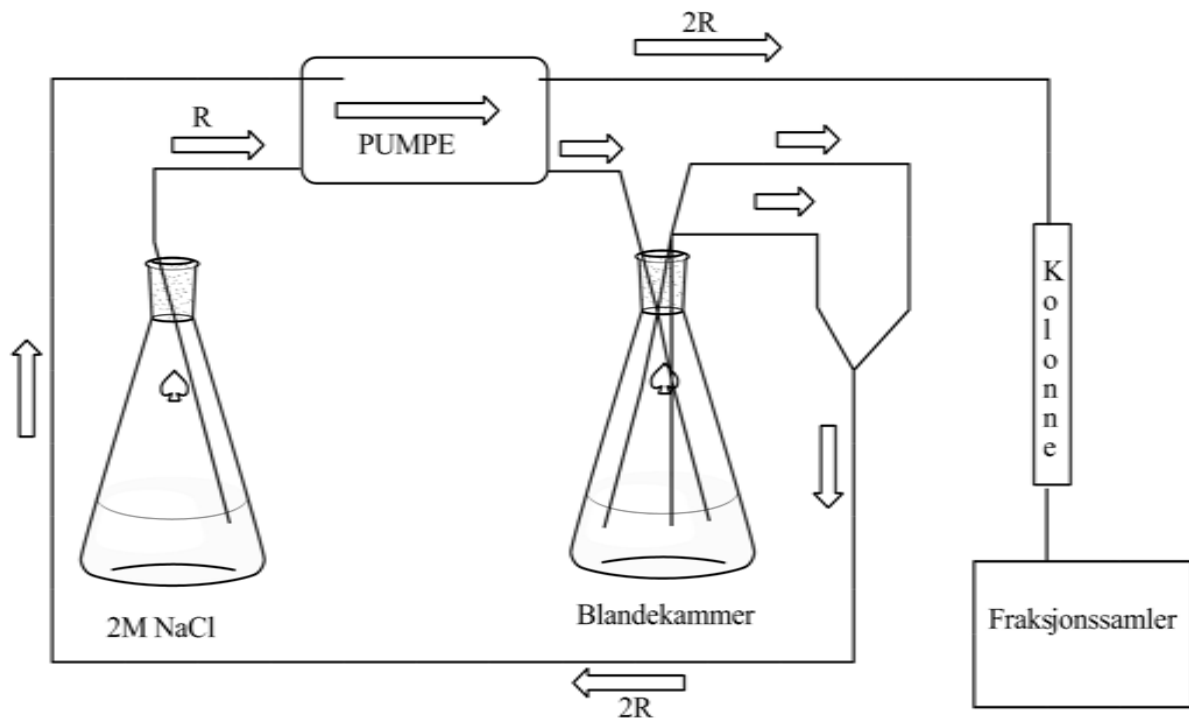
1M Natriumacetat pH 3 (aq) (Prolabo)

0,05 % NaN₃ (aq) (Merck)

Prosedyre

A: Applisering og eluering

1. Ca 100 ml prøve ble applisert på kolonnen med en flowhastighet på 1 ml/min.
2. De nøytrale molekylene ble eluert ut med 2 kolonnevolum destillert vann med flowhastighet på 2 ml/min.
3. Deretter ble de sure polysakkaridene eluert ut med NaCl-gradient (0-1,5 M) Flowhastigheten fra saltløsningen til blandekar: 1 ml /min Flowhastigheten fra blandekar til kolonne: 2 ml/min. Se figur 5.2 for oppsett av NaCl-gradienten.



Figur 5.2 Oppsett for NaCl-gradient

4. Saltgradienten ble beregnet etter følgende formel: $C/T = (C_0 \times R)/V_0$.
5. 180 fraksjoner ble samlet opp med 10 ml i hvert reagensrør
6. På bakgrunn av resultater fra fenolsvovelsyretesten (metode 5.3.1) ble fraksjonene med polysakkarider samlet inn, dialysert og frysetørket.
7. Kolonnen ble deretter eluert med 2 M NaCl i 2 timer.
8. Deretter ble kolonnen vasket og regenerert etter prosedyren beskrevet under.
9. Punkt 1-8 ble gjennomført til ønsket mengde prøvemateriale var samlet opp.

Vask og regenerering av kolonnen

1. Dersom kolonnen var sterkt farget på toppen ble dette laget fjernet med en pasteurpipette
2. Kolonnen ble så snudd 180°
3. Kolonnen ble vasket med 2 kolonnevolum 1 M NaOH
4. 1,5 kolonnevolum med 2 M NaCl ble eluert for å regenerere kolonnen med kloridioner
5. Det ble vasket med destillert vann helt til 2 ml eluat ikke ble blakket av 1 dråpe AgNO_3 -løsning, ca 5 kolonnevolum

Dersom kolonnen var veldig skitten ble det i tillegg vasket med natriumacetat. Prosedyren ble da som følger:

1. Hvis kolonnen var sterkt farget på toppen ble dette laget fjernet med en pasteurpipette
2. Kolonnen ble så snudd 180°
3. 1 kolonnevolum 1M natriumacetat pH 3 ble eluert
4. Kolonnen ble vasket med 2 kolonnevolum 1 M NaOH
5. 1,5 kolonnevolum med 2 M NaCl ble eluert for å regenerere kolonnen med kloridioner
6. Det ble vasket med destillert vann helt til 2 ml eluat ikke ble blakket av 1 dråpe AgNO₃-løsning, ca 5 kolonnevolum

Kolonnen ble lagret i 0,05 % Natriumazid ved 4 °C

5.2.5 Gelfiltrering

Gelfiltrering benyttes for å separere høymolekylære stoffer etter molekulstørrelse og konfigurasjon. Stasjonærfasen er et porøst pakkemateriale bestående av små kulerunde partikler med gitt porestørrelse. Molekyler som er løst i den mobile fase og som er for store til å passere gjennom porene, blir ført med mobilfasen mellom partiklene og elueres ut først ved det såkalte void volumet (V_0). De mindre molekylene vil retarderes på kolonnen fordi de vandrer ut og inn av porene i partiklene. (Greibrokk et al. 1998)

Bio-Gel P-30

Bio-Gel P-30 består av polyakrylamidpartikler. Disse er ekstremt hydrofile, og nesten uten ladning. Cut-off verdien til Bio-Gel P-30 er 40 000 Da, og den separerer molekyler som har en størrelse mellom 2 500 og 40 000 Da. Molekyler større enn dette vil komme ut med voidvolumet V_0 . (BIO-RAD 2000)

Utstyr

Kolonne:	XK26 (Pharmacia) L:100 cm, B:5 cm.
Pakkemateriale:	Bio-gel P 30 100-200 mesh (wet), (Bio-rad laboratoris, Knr:73203)
Kolonnevolum etter pakking:	ca 470 ml, L: 89 cm.

Pumpe:	SPETEC Biotech
Fraksjonssamler:	Superfrac, Pharmacia LKB
Filter:	Acrodisc [®] 32 mm 0,45 µm Supor [®] membrane (Pall [®])

Reagenser

Destillert vann
0,05 % NaN₃ (Merck)

Prosedyre

A: Applisering og eluering av prøve

1. 4-5 ml prøve ble applisert på kolonnen med en hastighet på 0,25 ml/min.
2. Etter applisering ble hastigheten økt til 0,5 ml/min
3. Det ble samlet opp 180 fraksjoner av 2 ml
4. Karbohydratprofil ble bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyretesten

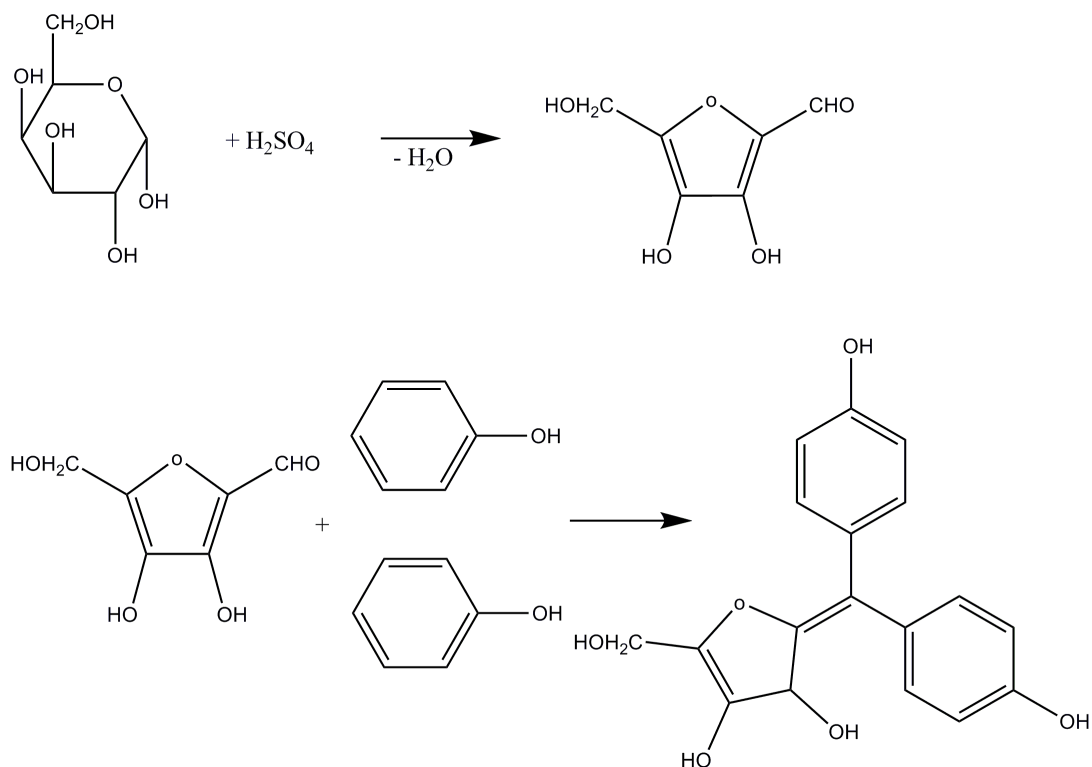
B: Vask og regenerering av kolonnen

Kolonnen ble vasket med halvannen kolonnevolum elueringsmiddel mellom prøvepåsettingene. Kolonnen ble konserverert med et kolonnevolum filtrert 0,05 % NaN₃ etter bruk.

5.3 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

5.3.1 Fenolsvovelsyretesten

Når sterke syrer og varme er til stede i nærvær av karbohydrater, skjer en rekke reaksjoner hvor furanderivater dannes. Når furanderivatene reagerer med seg selv eller fenoliske forbindelser dannes fargede komplekser med en gulaktig mørk farge, se figur 5.3. Fargen kan måles spektrofotometrisk ved 490 nm. (Brummer og Cui 2005) Informasjonen fra fenolsvovelsyretesten blir brukt til å slå sammen fraksjoner etter separasjon på kolonner.



Figur 5.3 Reaksjon mellom monosakkarid og svovelsyre til et anhydrosukker, som deretter kondenserer med to fenolmolekyler til et gulfarget kompleks (Sveaas 2007)

Utstyr

Glassrør

Finnpipette[®], 40-200 µl

Gilson Microman[®] pipette 100 µl

Gilson Microman[®] pistons og spisser

Whirlimixer, Fisons

Mikrotiterplater med flatbunn

Microplate Reader Model 3550 (BIO-RAD)

Briller

Hansker

Reagenser

4 % fenol (aq)

Konsentrert svovelsyre (Merck)

Destillert vann

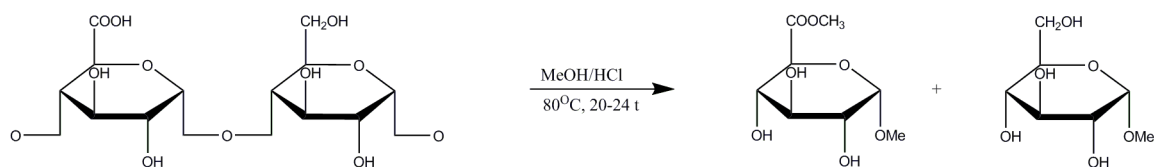
Prosedyre

1. 100 μ l av hver eller hver 2. fraksjon ble overført til glassrør
2. 200 μ l 4 % fenol og 1 ml konsentrert svovelsyre ble tilsatt
3. Blandingen ble mikset godt på whirlmikser og satt til henstand ved romtemperatur i 30 minutter
4. Løsningen ble mikset kort på whirlmikser og 100 μ l fra hvert glassrør ble overført til brønner på mikrotiterplate
5. Absorbansen ble avlest ved 490 nm (metode 5.1.13)

5.3.2 Monosakkaridbestemmeslelse

Metanolyse

For å analysere monosakkaridsammensetningen i polysakkaridene må glykosidbindingene mellom polysakkaridenes monomere brytes. Når disse brytes i surt, vannfritt metanolmiljø vil det dannes metylglykosider av de enkelte monosakkaridene. OH-gruppene ved C1 metyleres, og COOH-gruppene i C6-posisjon på uronsyrene vil metylforestres, se figur 5.4. Reaksjonen foregår i vannfritt miljø for å hindre hydrolyse. (Chambers og Clamp 1971)



Figur 5.4 Metanolyse av en glykosidbinding mellom et surt og et nøytralt monosakkarid i en polysakkaridkjede (Inngjerdingen 2000)

Utstyr

Supelcorør (syrevaskede) med teflonbelagt skrukork

Parafilm

P₂O₅-evakuert vakuumsikator

SMI-pipette (100 μ l)

Pasteurpipette med ballong (1 ml)

Varmeskap

Nitrogengassoppsett for inndamping

Varmeenhet til tørking under nitrogengass: Reacti-Therm™ III Heating Module (Pierce)

Reagenser

4 M HCl i metanol

1,0 µg/µl mannitol i 1 M HCl i metanol (intern standard)

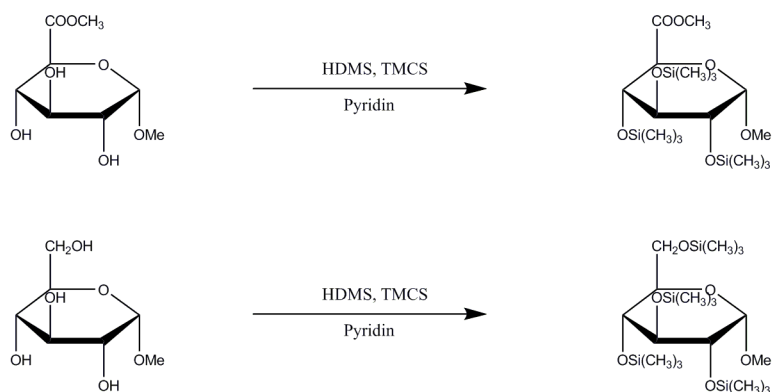
Vannfri metanol

Prosedyre

1. 1 mg prøvemateriale ble veid inn i syrevaskede supelcorør
2. Supelcorørene ble dekket med perforert parafilm og tørket under vakuum i P₂O₅-eksikator ved romtemperatur i 4-6 timer.
3. 1 ml 4 M HCl i metanol og 100 µl mannitolløsning (I.S.) ble tilsatt prøvene.
4. Korkene ble skrudd til og prøvene ble inkubert i varmeskap i 20-24 timer. Etter 10-15 minutter ble korkene skrudd ytterligere til for å unngå fordamping av metanolen.
5. Korkene ble med jevne mellomrom skrudd opp og godt igjen for å lette på trykket
6. Prøvene ble tørket under nitrogengass ved romtemperatur
7. 200 µl vannfri metanol ble tilsatt, og prøvene ble igjen tørket under nitrogengass
8. Punkt 7 ble gjentatt 2 ganger
9. Prøvene ble tørket i P₂O₅-eksikator ved romtemperatur i minst 1 time før TMS-derivatisering

TMS-derivatisering

Det finnes mange hydroksylgrupper og karboksylsyregrupper i polysakkarider. Dette er polare funksjonelle grupper som nedsetter flyktigheten til polysakkaridene. Flyktigheten til polysakkaridene må derfor økes før monosakkaridsammensetningen kan analyseres ved hjelp av GC. Ved å la alle polare hydroksylgruppene i molekylet reagere med TMS-reagens får man termisk stabile og flyktige TMS-derivater som er velegnet til GC, se figur 5.5. (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)



Figur 5.5 Reaksjon mellom metylglykosid med og uten metylestergrupper med TMS-reagens (Inngjerdingen 2000)

Utstyr

SMI-pipette (200 µl)

Whirlimixer, Fisons

Reagenser

TMS-reagens: Trimetyklorsilan (TMCS) (Fluka) 1 ml
 Heksametyldisilazan (HMDS) (Aldrich) 2 ml
 Pyridin (vannfri) (Merck) 5 ml

Prosedyre

1. Metanoliserte prøver fra metanolysen ble tilsatt 200µl TMS-reagens og mikset godt
2. Prøvene ble satt til henstand i romtemperatur i minst 30 minutter før gasskromatografisk analyse

Gasskromatografi

Gasskromatografi er en separasjonsmetode for stoffer i gassform. Flyktigheten til stoffene er temperaturavhengige, jo høyere temperatur, desto mer flyktige blir stoffene. Temperaturen bør imidlertid ikke bli for høy da stoffer kan dekomponere ved for høye temperaturer.

Mobilfasen er en inert gass, som under trykk strømmer gjennom en oppvarmet kolonne. Mobilfasen kalles også for bæregass. Den stasjonære fasen er en temperaturstabil væske.

Siden GC kolonner skal ha en temperatur på opp til 300 °C er utvalget av stoffer som egner seg som stasjonærfase begrenset. Polysiloksaner er de viktigste stasjonærfasene.

Prøvene er vanligvis løst i et flyktig løsemiddel, og injiseres med en sprøyte i injektoren. Det er vanlig å injisere mellom 0,5 og 2 µl. Temperaturen i injektoren vil være så høy at stoffene fordampes umiddelbart, og bæregassen frakter stoffene i gassform til kolonnen. I kolonnen vil stoffene fordele seg mellom bæregassen og stasjonærfasen. Stoffene vil vandre gjennom kolonnen med en hastighet som er avhengig av deres flyktighet, reaksjon med stasjonærfasen og temperaturen. Til slutt detekteres stoffene av en detektor, som er plassert ved utgangen av kolonnen. Det finnes en lang rekke detektorer til GC. I dette tilfellet ble det benyttet en flammeionisasjonsdetektor (FID). Når organiske stoffer brenner i en flamme dannes det ioner og elektroner. Mengden av ladede partikler som dannes kan måles ved å legge et potensial på 300 V mellom flammetippen og en samleelektrode like over flammen. Mengden av ladede partikler som dannes er proporsjonal med mengden av organisk stoff som brenner.

Det kan dannes opp til fem metylglykosider av hvert monosakkarid. Monosakkaridene finnes både i åpen og ringstruktur. Når monosakkaridene er i ringstruktur kan de være både i pyranose- og furanoseform, og disse kan igjen opptre som α - og β -anomerer. Hvert monosakkarid har et særegent mønster som kan brukes som metode for identifikasjon.

For å korrigere for tilfeldige endringer som kan skje under prøveopparbeidelsen og under analysen blir det tilsatt en intern standard. Mengden av de ulike monosakkaridene bestemmes kvantitativt ut fra en forhåndslagt standardkurve for en blanding av alle monosakkaridene. (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

Utstyr

Gasskromatograf:	Carlo Erba 6000 Vega Series 2
Programmeringsenhet:	ICU 600
Integrator:	Chromcard
Detektor:	Flammeioniseringsdetektor (FID) med H ₂ og O ₂ til flammen
Injektor:	Splitt:splittless
Kolonne:	"Fused silica" kapillærkolonne

Lengde:	30 m
Indre diameter:	0,32 mm
Filmtykkelse:	0,25 μm
Bæregass:	Helium

Betingelser for GC-systemet

Flow: Gjennom kolonnen:	1,8 ml/min (37,6 cm/sek)
Splitt flow:	≈ 11 ml/min
Splittforhold:	1:6
Injiseringsvolum:	0,5-1,0 μl
Injektortemperatur:	260 °C
Detektortemperatur:	310 °C
Temperaturprogram:	140 °C $\xrightarrow{1\text{ °C/min}}$ 170 °C $\xrightarrow{6\text{ °C/min}}$ 250 °C

Reagenser

Pyridin (Merck)

Prosedyre

1. Det ble åpnet for gasstrømmene, og GC og integratoren ble programmert
2. Sprøyten ble skylt med pyridin
3. 0,5-1 μl av den TMS-derivatiserte prøven ble injisert
4. Sprøyten ble skylt med pyridin mellom hver prøveinjeksjon, samt etter siste injeksjon
5. Innstillingene på integratoren ble justert for å tilpasse kromatogrammet
6. Gassen til detektoren ble skrudd av etter kjøring. Hele programmet tok ca 50 minutter

5.3.3 FPLC - Superdex 200

Molekylvekstdistribusjonen i polysakkaridprøver ble bestemt ved hjelp av FPLC og kjente dekanstandarder. Kolonnematerialet Superdex 200 består av kovalent bundet dextran som er kryssbundet med porøse agarosepartikler. Dette materialet separerer prøvene etter

gelfiltreringsprisippet, med optimalt separasjonsområde for dextraner fra 1000 – 100 000 Da. FPLC er en type kolonnekromatografi som opprinnelig er ment for rensing eller separering av proteiner, men den egner seg også for arbeid med polysakkarider. (GE Healthcare Bio-Sciences AB 2005)

Etter separasjon på kolonnen brukes en differensial refraktiv indeks detektor. Den består av et optisk system hvor lys blir sendt på en flowcelle, som inneholder prøven og en referanse, og tilbake på en fotodiode. Denne fotodioden registrerer endringer, i forhold til referansen, når prøven går igjennom flowcellen. Denne endringen sendes til skriveren som visualiserer dette ved å tegne kurver.

Utstyr

Kolonne:	XK 10/300
	Høyde: 30 cm Diameter: 1 cm
Matriks:	Superdex™ 200 10/300 GL
Kolonnevolum:	ca 24 ml

ÄKTA-FPLC

Dataprogram:	UNICORN Version 4.0
Detektor:	RID-10A, Shimadzu® 52
Skriver:	REC 112
Pumpe:	P-920
Monitor:	UPC-900
Injektor:	Valve Inv-907
	Superloop, 0,5 og 1 ml
Fraksjonssamler:	Frac-900
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør SB 7 ml, Heger AS
Filter:	Acrodisc® Syringe Filter 0,2 µm Supor® membrane, Low Protein Binding, Non-Pyrogenic (Pall®)
	Plastsprøyter BD, 1 ml
	Begerglass
	Magnet og magnetrører

Betingelser

Elueringshastighet:	0,5 ml/min
Fraksjonssamler:	1 ml per rør
Prøvemengde:	1 mg prøve løst i 0,5 eller 1 ml 10 mM NaCl-løsning
Elueringsmiddel:	10 mM NaCl-løsning

Reagenser

20 % etanol
10 mM NaCl-løsning
Destillert vann

Dekstranstandarder

Dextran B512, Fraction 11640-II-IX, M_w 5 600
Dextran standard from *Leuconostoc mesenteroids*, Fluka 31422, M_w 150 000
Dextran B512, Dex 40 T8630 Fr 7, M_w 19 000

Prosedyre

1. 1 mg prøve ble løst i 0,5 eller 1 ml 10 mM NaCl.
2. Prøven ble filtrert 0,22 μ m
3. Løsningen ble applisert på kolonnen ved hjelp av superloop-prinsippet.
4. Det ble eluert med en hastighet på 0,5 ml/min og i hvert rør ble det samlet opp 1 ml.
5. Elueringsprofilen ble bestemt ut i fra fenolsvovelsyretesten (metode 5.3.1) og resultatet fra FPLC-systemet.
6. Vask av kolonnen med destillert vann var inkludert i den forhåndsprogrammerte metoden
7. Kolonnen ble konserverert med 20 % etanol og lagret ved 4 °C

5.3.4 Detektering av ketoser i prøven

Prinsipp

Ved svak hydrolyse forblir ketoser forblir intakte uten å konvertere til aldoser. Ketosene kan deretter påvises ved tilsetning av urea-HCl. Urea-HCl vil reagere med ketongrupper, og danne et blåfarget kompleks.

Utstyr

Liten rundkolbe med kork

Varmeskap

Spraydiode

Rotavapor

Reagenser

1M HCl

Destillert vann

Sprayreagens: 5 g urea løses i 20 ml 2M HCl. Løsningen fortynnes deretter med 100 ml etanol (96 % v/v)

Prosedyre

1. 1 mg prøvemateriale veies ut
2. 1 ml 1M HCl tilsettes
3. Løsningen inkubes i varmeskap i 1 time ved 80 °C
4. Løsningen dampes inn til tørrhet på rotavapor
5. Løs i 1 ml destillert vann
6. 1 dråpe dryppes på filterpapir og tørkes
7. Papiret sprayeres med 5 % Urea i 2M HCl-løsning
8. Papiret varmes i varmeskap ved 105 °C i 5 minutter

5.4 Strukturoppklaring

5.4.1 Ezymatisk degradering

For å skille de forgrenede områdene fra resten av pektinet benyttes enzymer med kjent aktivitet. Uronsyrene i prøven deesterifiseres med NaOH for bedre effekt av enzymet. Endo-polygalakturonanase spalter deretter α -1 \rightarrow 4-D-glykosidbindinger ved hydrolyse, i områder med ikke-esterifisert homogalakturonan. De forgrenede områdene skilles fra de avspaltede molekylene av lavere vekt på gelfiltreringskolonnen BIOGEL P-30 (Voragen et al. 2000; Benen og Visser 2002)

Utstyr

Liten erlenmeyerkolbe

Magnetrører og magnet

Ultralydbad

pH-papir

Filter: Acrodisc[®] 32 mm 0,45 μ m Supor[®] membrane (Pall[®])

Whirlimixer

Varmeskap

Reagenser

0,1 M NaOH(aq) (Prolabo)

Eddiksyre p.a.

Toluen

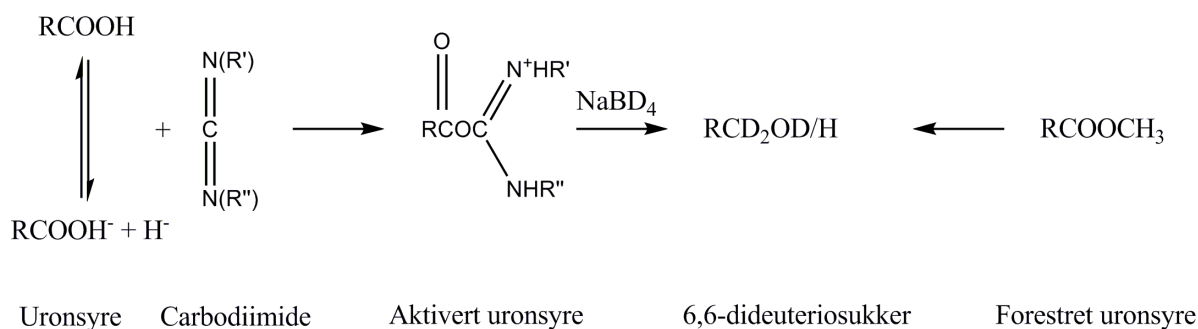
50 mM natrium-acetatbuffer (pH 4,2) (aq)

Endo-polygalacturonase: 5000U/ml i 3,2 M ammoniumsulfat LOT; MPG00301, EXP: 2010 (Megazyme)

Prosedyre

1. 30 mg frysetørket prøve ble løst i 9 ml 0,1 M NaOH i en liten erlenmeyerkolbe
2. Prøven ble sonikert i kort tid på ultralydbad for at den skulle løse seg
3. Prøven ble satt til henstand godt tildekket ved romtemperatur i 2 timer

Før prøvene kan metyleres må frie uronsyrer og forestrede uronsyrer reduseres. Forestrede uronsyrer kan reduseres direkte til primære alkoholer ved hjelp av NaBD₄, mens frie uronsyrer aktiveres med carbodiimide før reduksjon. Begge reaksjonene har 6,6-dideuteriosukker som produkt, se figur 5.6. Disse skilles fra nøytrale sukker ved GC-MS-analyser pga annen fragmentmasse ($M^+ + 2$) (Kim og Carpita 1992)



Figur 5.6 Aktivering og reduksjon av karboksylsyregruppe i fri uronsyre og reduksjonen av forestret uronsyregruppe (Inngjerdningen 2000)

Utstyr

Rundkolber, 50 ml

Syrevaskede metyleringsrør med skrukork, 15 ml

Dialyseslanger: Spectra/Por® Dialysis Membrane, MWCO 3,500, d: 29 mm

Bøtte

SMI-pipetter (100 µl og 200 µl)

Glasspipetter med ballong

Minishaker MS2, IKA®

Is

Reagenser

500 mM imidazole-HCl (aq)

0,2 M MES (2-[N-morpholino]etan svovelsyre) (aq) (Sigma)

Carbodiimide (1-cyclohexyl-3-(2-morpholino) carbodiimide-metho-p-toluene sulphonate) (aq) (Aldrich)

2 M TRIZMA (tris [hydroksymetyl] aminometan) (aq) (Sigma)

Natriumbordeuterid (NaBD₄) (aq) (Aldrich)

0,05 M NaOH (aq) (Prolabo)

Iseddik

Metanol (Merck)

Destillert vann

Prosedyre

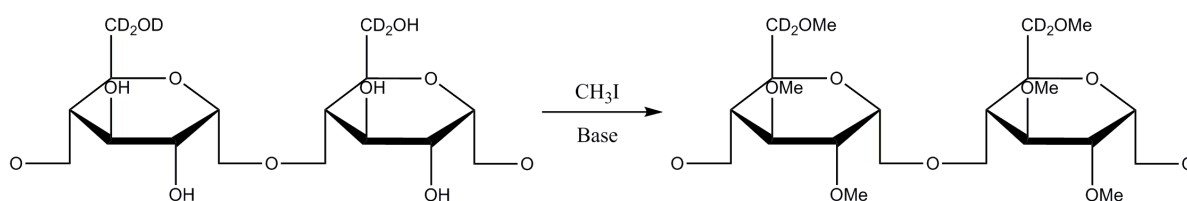
1. 2-3 mg prøve ble løst i 5 ml iskald 500 mM imidazole-HCl
2. Karboksylsyrene ble redusert ved å tilsette 1 ml nylaget 100 mg/ml NaBD₄ i imidazole-HCl i 3 porsjoner (300 µl + 300 µl + 400 µl). Prøvene ble mikset og satt på is i 5 minutter etter de to første tilsetningene, og 30 minutter etter siste tilsetning
3. Overskudd av reaktant ble fjernet ved langsom tilsetning av 5 x 100 µl iseddik. Reaksjonen ble antatt fullført når løsningen ikke lenger boblet og pH < 7.
4. Prøvene ble dialysert (metode 5.1.9)
5. Prøvene ble deretter frysetørket (metode 5.1.11)
6. De frysetørkede prøvene ble løst i 1 ml vann og tilsatt 200 µl MES og 400 µl nylaget 500 mg/ml carbodiimide i destillert vann.
7. Løsningen ble så inkubert i 3 timer ved ca 25 °C.
8. 1 ml 2 M TRIZMA ble tilsatt, og prøven ble deretter avkjølt på is.

9. Prøvene ble tilsatt 1 ml nylaget 70 mg/ml NaBD4 i 0,05 M NaOH og inkubert over natten ved 4 °C.
10. Overskudd av reaktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av 5 x 100 µl iseddik. Nøytraliseringsreaksjonen ble antatt fullført når løsningen ikke lenger boblet og pH var < 7.
11. Prøvene ble dialysert (metode 5.1.9) og frysetørket (metode 5.1.11).

Metylering

Prinsipp

Metylering av frie hydroksylgrupper i polysakkarider skjer i et sterkt basisk miljø, hvor man tilsetter et metyleringsreagens. Det sterkt basiske miljøet dannes av karbanionet av dimetylsulfoksid (DMSO) og OH⁻ som ioniserer de frie hydroksylgruppene fra karboksylsyre-reduksjonen. Disse metyleres videre i en reaksjon med metyljodid, som er metyleringsreagenset, se figur 5,7. (Ciucanu og Kerek 1984)



Figur 5.7 Metylering av frie hydroksylsyregrupper (Inngjerdningen 2000)

Utstyr

Brand Transferpettor 50-200 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

MS2 Minishake IKA[®]

Nitrogengassoppsett for inndamping

Varmeanhet til tørking under nitrogengass: Reacti-Therm[™] III Heating Module (Pierce)

Ristestativ: Vibrax-VXR (IKA Labortechnik)

Agatmorter med pistill

Whirlimixer (Fisons)

Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4 KR

Ultralydbad

Varmeskap

Pasteurpipetter

Reagenser

Vannfri metanol

Dimetylsulfoksid (DMSO) (aq) (Merck)

Tørre NaOH-pellets

Metyljodid (Fluka) (aq)

100 mg/ml natriumtiosulfat i destillert vann (aq) (Merck)

Kloroform (Prolabo)

Prosedyre

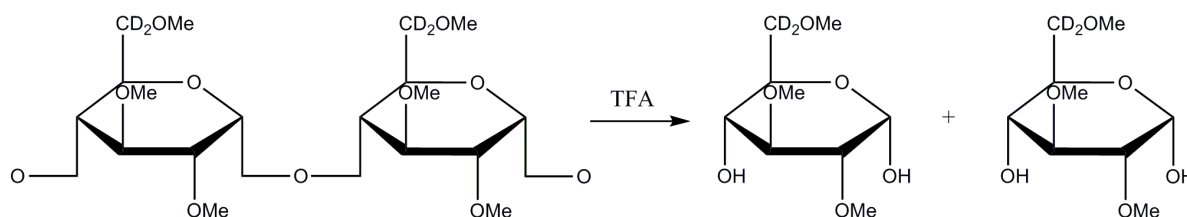
1. Frysetørket prøve fra karboksylsyreduksjonene ble dehydrert ved tilsetning av 200 µl metanol og tørket under nitrogengass.
2. Prøven ble tilsatt 500 µl DMSO og satt på risting i ca 20 minutter ved ca 200 rpm, for å løse glykanene. Dårlig løselige prøver ble sonikert på ultralydbad i 1 minutt.
3. Det ble laget en suspensjon av tørre NaOH pellets knust i DMSO, ved hjelp av agatmorter og pistill. 2 pellets per ml som gir en konsentrasjon på ca 120 mg/ml
4. 500 µl av suspensjonen ble tilsatt hver av prøvene ved hjelp av SMI-pipette, uten å berøre glassveggene
5. Prøvene ble gjennomblåst med nitrogen og satt på ristemaskin i 30 minutter ved 200 rpm.
6. 100 µl CH_3I ble tilsatt og ristet videre på maskin i 10 minutter.
7. Punkt 5 ble gjentatt.
8. 200 µl CH_3I ble tilsatt og ristet på maskin i 20 minutter.
9. Prøvene ble tilsatt 2 ml kloroform og 10 ml nylaget 100 mg/ml Na-thiosulfat i destillert vann.
10. Prøvene ble mikset på whirlmikser i minst 40 sekunder, og deretter sentrifugert ved 1000 rpm i 3 minutter for å separere fasene.
11. Vannfasen ble fjernet og kastet.
12. Kloroformfasen ble vasket 4 ganger med 5 ml destillert vann, ristet og sentrifugert. Vannfasen og mellomsjiktet fjernes med en pasteurpipette.

13. Kloroformfasen ble tørket under nitrogengass.

Hydrolyse

Prinsipp

Metylerede polysakkarider spaltes til monosakkarider ved hydrolyse i surt miljø, se figur 5.8. (Kim og Carpita 1992)



Figur 5.8 Hydrolyse av metylerte polysakkarider med TFA (Inngjerdingen 2000)

Utstyr

Nitrogengassoppsett for inndamping

Varmeenhet til tørking under nitrogengass: Reacti-Therm™ III Heating Module (Pierce)

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

Varmeskap

Reagenser

2,5 M Trifluoreddiksyre (TFA) (Merck)

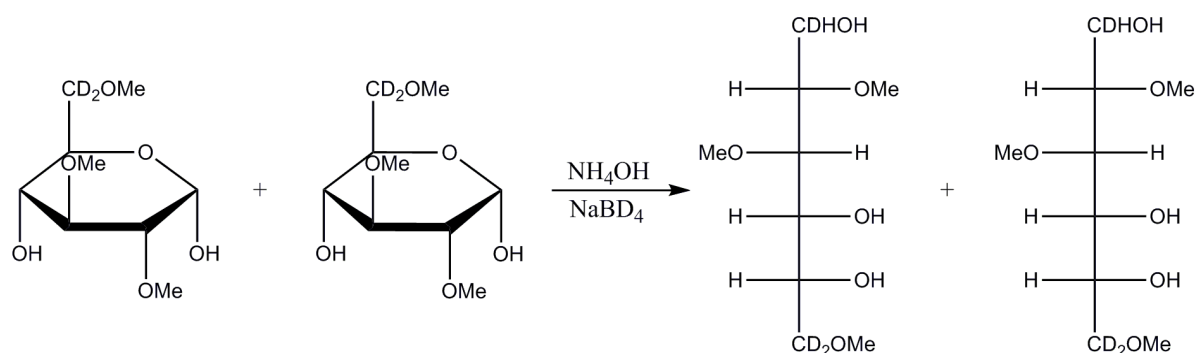
Prosedyre

1. 500 µl 2,5 M TFA ble tilsatt de metylerte prøvene og flushet med nitrogengass
2. Prøvene ble inkubert ved 100 °C i 2 timer før de ble avkjølt og dampet inn til tørrhet med nitrogengass

Reduksjon

Prinsipp

Ringstrukturen i monosakkarider brytes ved at det sykliske hemiacetalet ved C1 reduseres til alditol, se figur 5.9. (Kim og Carpita 1992)



Figur 5.9 Reduksjon av hydroksylgrupper ved C1 (Inngjerdingen 2000)

Utstyr

Ultralydbad

Varmeskap

Nitrogengassoppsett for inndamping

Varmeenhet til tørking under nitrogengass: Reacti-Therm™ III Heating Module (Pierce)

Finn®-pipetter® (Thermo Labsystems) med spisser

Reagenser

2 M NH_3 (Merck)

1 M NaBD_4 , nylaget (Aldrich)

Iseddik (Prolabo)

5 % eddiksyre i metanol

Metanol (Merck)

Prosedyre

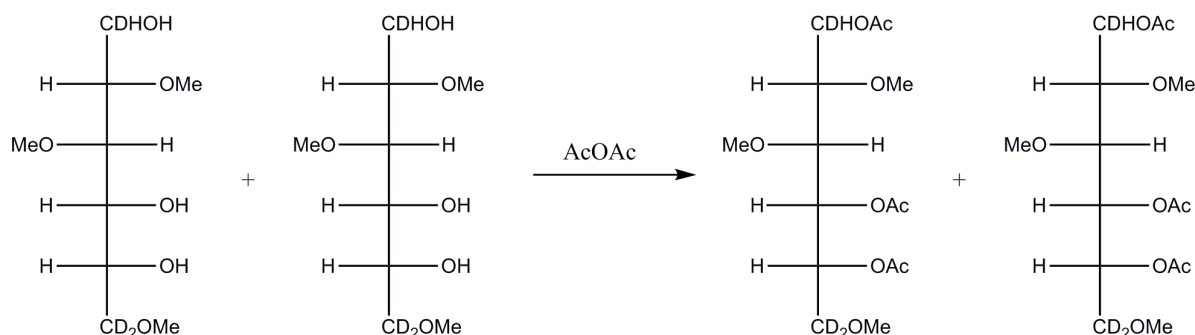
1. Hydrolysert prøve ble tilsatt 500 μl 2 M NH_3 og 500 μl 1M NaBD_4 i 2 M NH_3

2. Løsningene ble sonikert på ultralydbad i 1 minutt før inkubering i varmeskap ved 60 °C i 1 time
3. Overskudd av reaktant ble ødelagt ved tilsetting av 3 x 50 µl iseddik.
4. Prøvene ble tørket under nitrogengass
5. 2,5 ml 5 % eddiksyre i metanol ble tilsatt før tørking under nitrogengass
6. Punkt 5 ble gjentatt
7. 2,5 ml metanol ble tilsatt for å fjerne borsyre. Prøvene ble deretter tørket under nitrogengass
8. Punkt 7 ble gjentatt

Acetylering

Prinsipp

Etter hydrolyse og reduksjon blir det dannet hydroksylgrupper. Disse acetyleres med eddiksyreanhydrid, slik at de blir mer egnet for GC-MS analyse, se figur 5.10. (Kim og Carpita 1992)



Figur 5.10 Acetylering med eddiksyreanhydrid(Inngjerdingen 2000)

Utstyr

MS2 Minishake IKA[®]

Ultralydbad

Sentrifuge

Nitrogengassoppsett for inndamping

Varmeeinheit til tørking under nitrogengass: Reacti-Therm™ III Heating Module (Pierce)

Finn®-pipetter® (Thermo Labsystems) med spisser

Brand Transferpettor 200 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

Pasteurpipetter

Supelcorør (4 ml) med teflonbelagt skrukork (PTFE/liner)

Reagenser

1-metylimidazol (Fluka)

Eddiksyreanhydrid (Merck)

Diklormetan (Merck)

Metanol, vannfri

Prinsipp

1. 200 µl 1-metylimidazol og 2 ml eddiksyreanhydrid ble tilsatt de reduserte prøvene. Prøvene ble blandet godt eller sonikert på ultralydbad og satt til henstand i romtemperatur i 10 minutter
2. Overskudd av eddiksyreanhydrid ble ødelagt ved tilsetning av 10 ml vann. Prøven ble blandet godt og satt til henstand i romtemperatur i 10 minutter
3. Delvis metylerte sukker ble ekstrahert med 2 x 1 ml diklormetan. For hver ekstraksjon ble prøven blandet godt, sentrifugert og diklormetanfasen samlet opp
4. Ekstraktene ble samlet opp og tilbakevasket med 2 x 5 ml vann
5. Diklormetanfasen ble overført til et Supelcorør og tørket under nitrogengass
6. Prøven ble løst i 50 µl vannfri metanol og analysert ved GC-MS

5.4.3 GC-MS

GC-MS-analyser ble utført av Finn Tønnesen ved Avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

De ferdig metylerte prøvene fra metode 5.4.2 ble analysert ved hjelp av GC-MS. Prøvene blir først separert på en GC-kolonne, som beskrevet under gasskromatografi i metode 5.3.2.

Stoffene kommer så til et massespektrometer. Her bombarderes organiske forbindelser med elektroner i vakuum. De ioniserte molekylene blir brutt ned til mindre deler som kalles fragmenter. Fragmentene blir separert etter forholdet mellom masse (m) og ladning (z), m/z. I detektoren registreres mengden av ioner som dannes, og hvilke masser disse har. Dette registreres i et massespektrum. Massespektrumet er karakteristisk for hvert stoff, og hjelper til med identifikasjon av stoffene. (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

Utstyr og betingelser

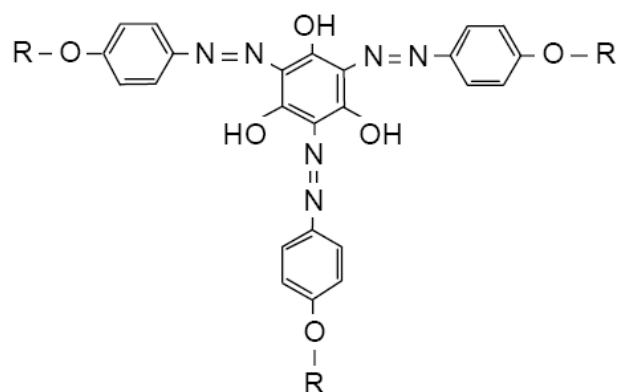
GC-MS:	GC 8000 series
Detektor:	Fisons Instruments, MD 800
Injektor:	Splitt (1:10)
Kolonne:	FactorFOUR™, VF-1ms
Filmtykkelse:	0,25 µm
Indre diameter:	0,25 mm
Lengde:	30 m
Temperaturområde:	80-280 °C
Injektortemperatur:	250 °C
Dataprogram:	Masslab 73
Viktige ioner:	45, 47, 117, 118, 161, 162, 163, 189, 190, 205, 207, 233, 234, 235, 261, 262, 305, 307

Temperaturprogram: 80 °C $\xrightarrow{30\text{ °C/min}}$ 170 °C $\xrightarrow{0,5\text{ °C/min}}$ 200 °C $\xrightarrow{30\text{ °C/min}}$ 280 °C

5.4.4 Identifikasjon av arabinogalaktan II ved hjelp av Yarivreagens

Prinsipp

Denne metoden brukes til kvalitativt å bestemme tilstedeværelsen av arabinogalaktan type II (AG-II) i testmaterialet. Testmateriale løst i vann appliseres i små brønner som er stemplet ut i et gelplate. Gelen inneholder yariv-reagens, se figur 5.11, et rødt fargestoff som har mulighet til å binde seg til arabinogalaktan-proteiner og danne en utfelling. Dette vises som en rød ring rundt prøvebrønnen. Det er bare AG-II som har mulighet til å danne bunnfall med yariv-reagens, AG-I forblir i løsningen. (Biosupplies_Australia_Pty_Ltd; Paulsen og Barsett 2005)



Figur 5.11 β -D-glukosyl yarivreagens, $R = \beta$ -D-glukosyl
(Biosupplies_Australia_Pty_Ltd)

Utstyr

Plate med justerbar høyde

Vater

Gelbond film: Gelbond film for agarosegel, GE Healthcare

Prøveglass

Whatmanpapir

Cellepapir

Kokeplate

Utstyr for stemping av brønner, koblet til vannsug

Kar med lokk

Reagenser

Yariv-reagens (1 mg/ml)

Standard: Gum Arabica, 1 mg/ml

Gel: For en plate med 1 mm geltykkelse:

35 mg Agarose (Bio-rad)

30 mg NaCl (Prolabo)

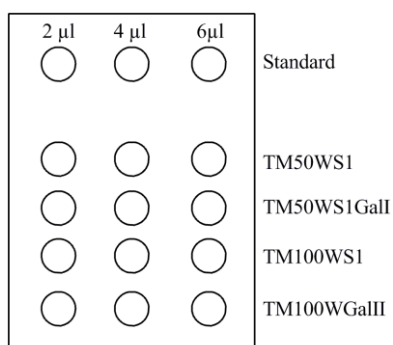
0,7 mg NaN₃ (Merck)

3,5 ml destillert vann

Prosedyre

1. 1 mg prøve ble veid ut, og løst i 125 μ l destillert vann, til en konsentrasjon på 8 mg/ml

2. Gelbondfilm ble klippet ut etter mal, ca 5 x 7 cm, og lagt i vater på den justerbare platen med den hydrofile siden opp.
3. Ingrediensene til gelen blandes sammen og kokes opp.
4. 100 µl Yariv-reagens tilsettes umiddelbart etter koking, og gelen helles ut på gelbondplaten.
5. Etter gelen har polymerisert stemples det ut små brønner ved hjelp av vannsug. 3 brønner for standarden og for hver prøve.
6. 2-, 4- og 6 µl (2-, 4- og 6 µg) av standarden appliseres i hver sin brønn.
7. 2-, 4- og 6 µl (16-, 32- og 48 µg) av hver prøve appliseres i hver sin brønn.



Figur 5.12 Oppsett for gelplaten

8. I bunnen av et kar legges et fuktet filterpapir. Plata legges ned i karet, og karet lukkes med lokk. La gelen stå i ca 24 timer ved romtemperatur
9. Resultatet sjekkes. Der hvor arabinogalaktan type II har felt ut med yariv-reagenset har det blitt dannet røde ringer rundt brønnene.
10. Platen legges på en glassplate med gelen opp
11. Et stykke vått whatmanpapir legges over gelen, uten luftbobler mellom gelen og papiret
12. Ca 10 cellepapir brettes dobbelt og plasseres over det våte whatmanpapiret. En glassplate legges over, og presses med en 2,5 litersflaske med vann i 10 minutter
13. Cellepapiret snus, og det presses i 10 minutter til
14. Platen scannes inn.

5.5 Biologisk aktivitet

5.5.1 Komplementfikseringstest

I komplementfikseringstesten måles det om polysakkaridene fra *Terminalia macroptera* interfererer med komplementsystemet. Dersom det måles en reduksjon i hemolysegrad for sensitiviserte røde blodceller fra sau (SRBC) som er dekket med antistoffer fra kanin, har polysakkaridene interferert med komplementsystemet. Komplement vil, dersom det er intakt, hemolysere erytrocyttene. Polysakkaridene i prøven får reagere med humant komplement før blodcellene blir tilsatt. Dersom prøven enten aktiverer eller hemmer komplement vil hemolysen av blodceller avta. Testen skiller ikke mellom komplementaktivering- og inhibering. Komplementaktivering medfører reduksjon av hemolyse på grunn av forbruk av komplement. Inhibisjon av komplement medfører reduksjon av hemolyse ved interaksjoner med enkelte komplementfaktorer slik at disse inaktiveres. (Michaelsen et al. 2000)

Utstyr

Sentrifuge	Heraeus Multifuge 3SR+ Centrifuge
Varmeskap med ristepate:	Termaks, 37 °C
Mikrotiterplater	96 brønner med rund og flat bunn (NUNC™ MICROWELL PLATE/ NUNC™:NUNCLON™ surface)
Mikroplateleser:	Thermomax
Whirlimixer (Fisons)	
Finn®-pipetter med spisser	

Reagenser

Fosfatbuffer	
Destillert vann	
Veronal/BSA buffer:	CFT pH 7,2 med 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) 30 % og 0,02 % natriumazid
Saueblod:	Hvit 147 25.09.08 Hvit 131 14.01.09

Antistoff:	Virion 9020 Amboceptor serum hemolysis Fortynnet i 1:10 veronalbuffer
Komplementkilde:	ECG 14.02.08
Standard:	<i>Plantago major</i> L, fraksjon II (PMII) 140294 AB, 1 mg/ml

Prosedyre

A: Vasking av saueblodceller

1. 100 µl blod per plate ble tatt ut uten å slemme opp blodet
2. Blodet ble vasket to ganger med fosfatbuffer og en gang med veronal/BSA-buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert og vaskevann ble fjernet

B: Sensibilisering av saueblodceller

1. 5,295 ml veronal/BSA-buffer ble tilsatt 15 µl Virion 9020 Amboceptor og 60 µl vaskede blodceller
2. Blandingen ble inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C
3. Blodet ble vasket to ganger med fosfatbuffer NaCl og en gang med veronal/BSA-buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert og vaskevann ble fjernet
4. 5,940 ml veronal/BSA-buffer ble tilsatt

C: Fortynning av prøver

1. Ca 1 mg frysetørket prøve ble løst i veronal/BSA-buffer til en 1 mg/ml-løsning
2. En fire-folds fortynningsrekke ble laget, se tabell 5.1

Rør nr	Kons µg/mL	
1	500	300 µL veronal/BSA buffer + 300 µL fra stamløsning
2	125	300 µL veronal/BSA buffer + 100 µL fra rør 1
3	31	300 µL veronal/BSA buffer + 100 µL fra rør 2
4	8	300 µL veronal/BSA buffer + 100 µL fra rør 3
5	2	300 µL veronal/BSA buffer + 100 µL fra rør 4
6	0,5	300 µL veronal/BSA buffer + 100 µL fra rør 5

Tabell 5.1 Firefolds fortynningsrekke for prøve

D: Titreringskurve for komplementkilde

1. 4 brønner i en rundbunnet mikrotiterplate ble tilsatt 100 µl vann og 28 brønner ble tilsatt 50 µl veronal/BSA-buffer
2. Komplement ble fortynnet med veronal/BSA-buffer som vist i tabell 5.2 og 50 µl av blandingene ble tilsatt brønnene med buffer (4 paralleller av hver fortynning)

Komplement:Buffer	Komplement (µl)	Veronal/BSA buffer (µl)
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990
1:110	10	1090

Tabell 5.2 Fortynning av komplementkilden

3. Platen ble tildekket og inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C
4. Det ble tilsatt 50 µl 1 % SRBC i alle brønnene og platen ble inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C
5. Platen ble sentrifugert og 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering
6. Absorbans ble avlest ved 405 nm
7. Riktig fortynning av komplement ble bestemt

E: Utføring av test

1. I en rundbunnet mikrotiterplate med 96 brønner ble det tilsatt 50 µl av hver fortynning av prøvene (2 paralleller av hver fortynning).
2. Det ble tilsatt 100 µl vann i 4 brønner for 100 % lysekontroll og 50 µl veronal/BSA-buffer i 4 brønner til kontroll.
3. Komplement ble tatt rett opp av fryseren og fortynnet til konsentrasjonen bestemt fra titreringskurven. 50 µl av den riktige fortynningen ble tilsatt alle brønner, bortsett fra 100 % lysekontroll.
4. Platen ble tildekket og inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C
5. 50 µl 1 % SRBC ble tilsatt hver brønn og platen ble deretter inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C

6. Platene ble sentrifugert før 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering
7. Absorbans ble målt ved 405 nm

F: Beregning

Lyseringsgrad som tar høyde for komplementets egenpåvirkning ble beregnet ut fra formelen:

$$\text{Lyseringsgrad} = \frac{A_{\text{kontroll}}}{A_{\text{vann}}} \times 100\%$$

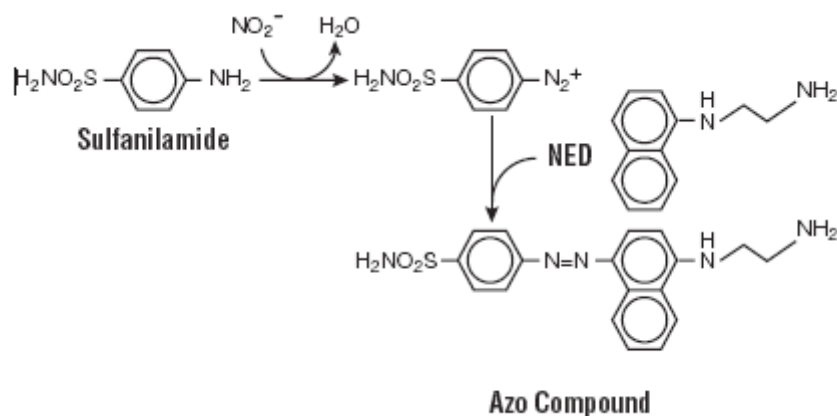
Inhiberingsgrad for prøvene ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\% \text{ inhibering} = \frac{A_{\text{kontroll}} - A_{\text{prøve}}}{A_{\text{kontroll}}} \times 100\%$$

5.5.2 Måling av NO-frigjøring fra makrofager

Måling av NO-frigjøring fra makrofager ble i sin helhet utført av post. doc. Parakashtha Ghildyal ved Anatomisk Avdeling, Rikshospitalet.

Når makrofager blir aktivert, stimuleres de til å utskille forskjellige mediatorer som bidrar til immunresponsen. En av disse mediatorene er nitrogenoksid (NO). NO brytes ned til to produkter. Ett av disse er den stabile og ikke flyktige forbindelsen nitritt (NO_2^-), som har vist seg velegnet som et mål på makrofagaktivitet. Griess-reagenssystemet baserer seg på den kjemiske reaksjonen vist i figur 5.13, der nitritt reagerer med sulfanilamid og N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) i surt miljø. Azo-forbindelsen som dannes farger løsningen rosa og konsentrasjon kan avleses ved absorbansmåling. Griess-reagenssystemet er i stand til å detektere nitritt i en mengde forskjellig væskematrikser, inkludert plasma, serum, urin og cellekulturmedium. (Promega_Corporation 2005)



Figur 5.13 Kjemiske reaksjoner involvert i NO_2^- -måling i Griess-reagenssystem (Promega_Corporation 2005)

5.5.3 Indusering av B-celle proliferasjon

Prinsipp

Test på B-celleproliferasjon ble i sin helhet utført av post. doc. Parakashtha Ghildyal ved Anatomisk Avdeling, Rikshospitalet.

B-celler og andre celler kan innfarges med fluorescerende farge (CFSE). Når B-celler blir aktivert, vil de dele seg. Celledeling vil føre til et gradvis tap av fargeintensiteten per celle, da dattercellene vil ha halvparten av CFSE i forhold til morcellen. Fluorescensen til cellepopulasjonen vil minke over tid ettersom cellene deler seg. Dette kan detekteres ved hjelp av flow cytometri.

I denne testen brukes B-celler fra rotter. Disse ble farget med fluorescerende farge (CFSE), tilsatt 100 $\mu\text{g/ml}$ prøve og inkubert i 5 dager. 500 ng/ml lipopolysakkarid (LPS) ble brukt som positiv kontroll. B-celler og medium alene ble også inkubert som kontroll. Dag 5 ble B-celleproliferasjonen analysert ved hjelp av flow cytometri

5.5.4 Modning av dendrittiske celler

Prinsipp

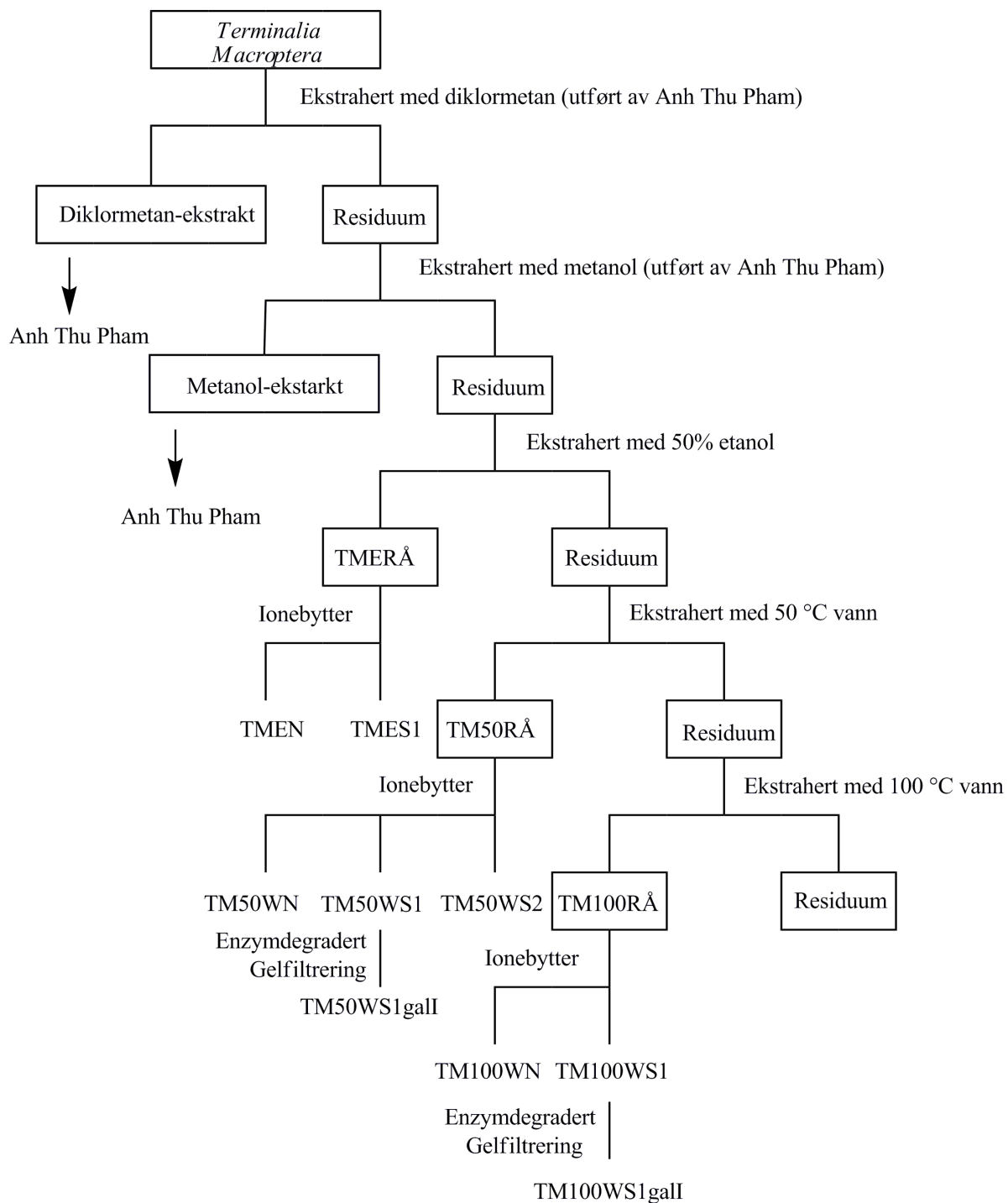
Test på modning av dendrittiske celler ble i sin helhet utført av post. doc. Parakashtha Ghildyal ved Anatomisk Avdeling, Rikshospitalet.

Når umodne dendritiske celler fra benmarg blir presentert for et antigen modnes de til modne dendritiske celler. I dette bio-assayet testes det om polysakkaridene fra *Terminalia macroptera* kan modne de dendritiske cellene.

Umodne dendritiske celler fra benmarg ble inkubert i 24 timer i en flatbunnet mikrotiterplate. Enten sammen med medium, med 500 ng/ml LPS eller med 100 µg/ml prøvemateriale. Den neste dagen ble de merket med CD11c-FITC (dendritisk celle-markør) og CD86-PE (modningsmarkør) Gjennomsnittelig fluorescensintensitet (GFI) ble målt ved hjelp av flow cytometri. Resultatene uttrykkes som GFI relatert til den ustimulerte kontrollen. Dersom GFI hos modningsmarkøren CD86 er større enn hos den ustimulerte kontrollen kan det tyde på at det er dannet en moden fenotype av de dendritiske cellene.

6. RESULTATER OG DISKUSJON

6.1 Isolering av polysakkarider



Figur 6.1 Flytskjema over arbeid utført på *Terminalia macroptera*

6.1.1 Ekstraksjon

676,6 g tørket plantemateriale ble overtatt fra Anh Thu Pham. Dette var ekstrahert med diklormetan og metanol, deretter tørket. Det tørkede plantematerialet ble først ekstrahert med 50 % etanol, og deretter med vann ved 50 °C og 100 °C. Oversikt over ekstraksjoner og annet arbeid utført på *Terminalia macroptera* finnes i figur 6.1 Råekstraktene fikk navnene TMERÅ, TM50WRÅ og TM100WRÅ. Alle ekstraktene var sterk farget, med en gulbrun farge. Etter volumreduksjon ved inndamping på rotavapor (TMERÅ) eller ultrafiltrering (TM50WRÅ og TM100WRÅ) og dialyse ble 1/10 av hvert råekstrakt frysetørket. Totalt utbytte ble beregnet, og presentert i tabell 6.1.

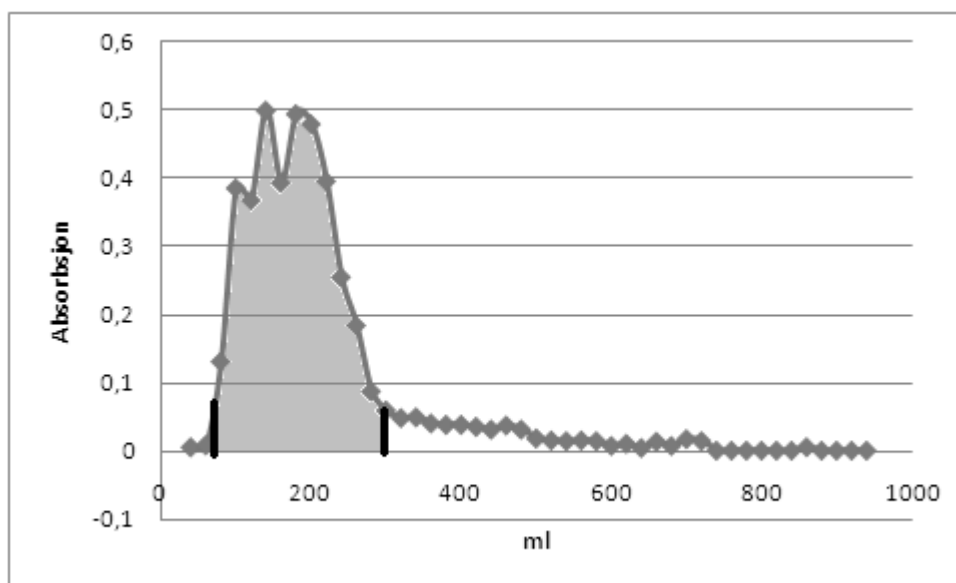
Tabell 6.1 Totalt utbytte av ekstraksjon

Fraksjon	Totalt utbytte
TMERÅ	17,38g
TM50WRÅ	1,41 g
TM100WRÅ	2,65 g

6.1.2 Ionebytterkromatografi – ANX Sepharose 4 fast flow

TMERÅ, TM50WRÅ og TM100WRÅ ble applisert på ANX Sepharose 4 fast flow ionebytterkolonne. Råekstraktene ble rensert opp ved hjelp av ionebytterkromatografi for å separere de nøytrale polysakkaridene fra de sure. De nøytrale fraksjonene ble eluert ut med destillert vann, og testet med fenolsvovelsyretesten (metode 5.3.1). De sure fraksjonene ble eluert med en NaCl-gradient (0-1,5M). Karbohydratelueringprofilen til fraksjonene ble funnet ved hjelp av fenolsvovelsyretesten (metode 5.3.1), og fraksjonene ble, som vist i figur 6.2, slått sammen på grunnlag av dette.

Det forelå 3 nøytrale fraksjoner, TMEN, TM50WN og TM100WN. Etter eluering med NaCl-gradient ble det delt inn i 4 forskjellige sure fraksjoner. TMES1, TM50WS1, TM50WS2 og TM100WS1. Utbyttet ble beregnet ut fra den mengden prøvemateriale som ble applisert på kolonnen, og presenteres i tabell 6.2. Alle fraksjonene ble tatt med videre, og det ble utført monosakkaridanalyse (metode 5.3.2), bindingsforholdanalyse (metode 5.4.2), komplementfikseringstest (metode 5.5.1), indusering av B-celleproliferasjon (metode 5.5.3) og NO-frigjøring fra makrofager ble målt (metode 5.5.2).



Figur 6.2 Karbohydratelueringprofilen til TM100WS1 etter eluering på ANX Sepharose 4 Fast Flow. Det grå området ble slått sammen til TM100WS1

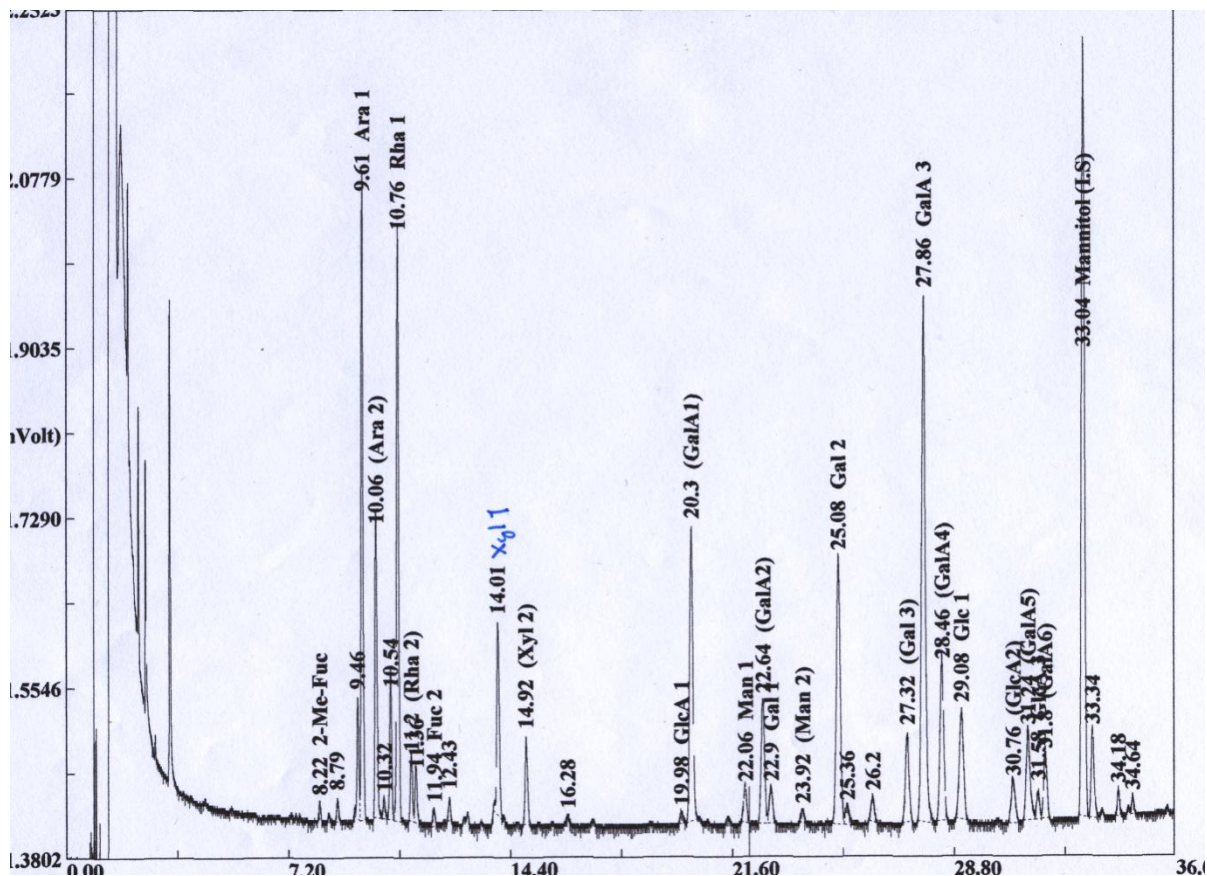
Tabell 6.2 Utbytte etter separasjon på ANX Sepharose 4 Fast Flow

Fraksjon	Utbytte (mg)	Utbytte (%)
TMEN	25,0	1,0
TMES1	50,9	2,1
TM50WN	27,6	7,3
TM50WS1	123,0	32,7
TM50WS2	22,9	6,1
TM100WN	56,2	7,2
TM100WS1	281,7	36,1

6.2 Strukturoppklaring

6.2.1 Monosakkaridanalyse

Karbohydratsammensetningen av alle fraksjonene ble bestemt etter metanolyse, TMS-derivatisering og GC-analyse. Hvert monosakkarid finnes i to eller flere konformasjoner, og vil av den grunn gi opphav til flere topper i kromatogrammet som danner monosakkaridspesifikke mønstre. Figur 6.3 viser det monosakkaridspesifikke mønsteret til TM100WS1



Figur 6.3 Kromatogram for monosakkaridsammensetningen til TM100WS1. Karakteristiske toppe er avmerket.

Tabell 6.3 viser monosakkaridsammensetningen til råekstraktene og ekstraktene som har blitt eluert på ionebytterkolonne. Nesten alle fraksjonene inneholder arabinose, rhamnose, galaktose og galakturonsyre. Dette er monosakkarider man finner mye av i pektintype polysakkarider. Alle fraksjonene har et relativt høyt innhold av arabinose, fra 12,6 % til 33,7 %. Andelen galaktose er også ganske høyt, men dette varierer mer mellom de forskjellige fraksjonene. Høyt arabinose og galaktoseinnhold kan tyde på hårete områder med arabinogalaktaner. Prøvene inneholder også rhamnose og galakturonsyre, med unntak av TM100WN. Dette kan indikere områder med rhamnogalakturonan.

Tabell 6.3 Monosakkaridsammensetningen til råekstraktene og fraksjonene etter ionebytterkromatografi

	TMERÅ	TMEN	TMES1	TM50WRÅ	TM50WN	TM50WS1	TM50WS2	TM100WRÅ	TM100WN	TM100WS1
Arabinose	24,2%	26,0%	22,0%	18,1%	22,1%	20,8%	12,6%	13,8%	33,7%	15,8%
Rhamnose	4,0%	8,0%	6,7%	5,6%	1,4%	11,2%	13,3%	4,2%	0,0%	10,7%
Fukose	-	-	-	0,3%	-	-	-	-	-	-
Xylose	1,3%	2,3%	2,0%	1,3%	1,6%	7,0%	2,0%	4,1%	2,4%	5,8%
Mannose	7,6%	7,4%	7,3%	6,0%	16,5%	2,5%	2,1%	5,0%	19,9%	1,6%
Galaktose	24,3%	17,5%	18,5%	21,2%	19,1%	24,0%	16,7%	11,1%	4,3%	13,8%
Glukose	38,6%	10,2%	10,9%	25,9%	36,4%	9,8%	7,2%	34,5%	39,7%	6,1%
Glukuronsyre	-	-	-	4,9%	2,1%	4,6%	3,9%	-	-	-
Galakturonsyre	-	28,7%	32,6%	16,6%	0,9%	19,9%	42,4%	27,1%	-	46,3%
Sum	100,0%	100,1%	100,0%	99,9%	100,1%	99,8%	100,2%	100,0%	100,0%	100,1%

Tabell 6.4 Monosakkaridsammensetningen uten mannose og galaktose i de sure fraksjonene

	TMERÅ	TMEN	TMES1	TM50WRÅ	TM50WN	TM50WS1	TM50WS2	TM100WRÅ	TM100WN	TM100WS1
Arabinose	24,2%	26,0%	26,9%	18,1%	22,1%	23,7%	13,8%	13,8%	33,7%	17,1%
Rhamnose	4,0%	8,0%	8,2%	5,6%	1,4%	12,8%	14,7%	4,2%	-	11,5%
Fukose	-	-	-	0,3%	-	-	-	0,2%	-	-
Xylose	1,3%	2,3%	2,5%	1,3%	1,6%	8,0%	2,1%	4,1%	2,4%	6,3%
Mannose	7,6%	7,4%	-	6,0%	16,5%	-	-	5,0%	19,9%	-
Galaktose	24,3%	17,5%	22,6%	21,2%	19,1%	27,4%	18,4%	11,1%	4,3%	14,9%
Glukose	38,6%	10,2%	-	25,9%	36,4%	-	-	34,5%	39,7%	-
Glukuronsyre	-	-	-	4,9%	2,1%	5,3%	4,3%	-	-	-
Galakturonsyre	-	28,7%	39,9%	16,6%	0,9%	22,7%	46,7%	27,1%	-	50,1%
Sum	100,0%	100,1%	100,1%	99,9%	100,1%	99,9%	100,0%	100,0%	100,0%	99,9%

Alle fraksjonene inneholder også mannose. Dette er ikke typisk for pektintype polysakkarider. Det er spesielt i de vandige nøytrale fraksjonene andelen mannose er høy. I de samme fraksjonene er også glukoseandelen høy. En hypotese er at dette skyldes innhold av fruktaner i planten. Disse spaltes ved metanolyse, og resulterer i høyere andeler av både mannose og glukose. Denne hypotesen ble siden bekreftet da det med metode 5.3.4 ble detektert ketoser i TM50WN, høyst sannsynlig fruktaner. Fruktaner blir retardert ved ionebytterkromatografi, og ikke alle fruktanene blir eluert ut med vann. Resten blir eluert ut med NaCl-gradienten, og en rest havner dermed i de sure fraksjonene. Med bakgrunn i dette velger man å se bort fra mannose og glukoseinnholdet i det videre arbeidet med de sure fraksjonene. Monosakkaridsammensetningen blir da som vist i tabell 6.4.

6.2.2 Bindingsforhold

Bindingsforholdene til monosakkaridene i råekstraktene og fraksjonene som ble rensert opp ved hjelp av ionebytterkromatografi, ble analysert etter først en karboksylsyre-reduksjon etterfulgt av metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse.

Tabell 6.5 viser fordelingen og bindingstypen til de ulike monosakkaridene. Resultatene fra metanolysen har blitt brukt til å finne mengdeforholdet av hvert monosakkarid. Som nevnt i kapittel 6.2.1 ser man bort fra mannose og glukoseinnholdet i de sure fraksjonene. Det er derfor monosakkaridinnholdet i tabell 6.4 som ligger til grunn for tabell 6.5. Innenfor hvert monosakkarid benyttes arealet under kurven (AUC) til å fastslå mengdeforholdene av hver enkelt bindingstype. Topper som utgjorde $< 1\%$ av totalinnholdet karbohydrat er nevnt som spor i tabellen.

Forbindelsene som stammer fra terminal glukose og glukuronsyre har lik retensjonstid ved GC-MS-analyse. Forholdet mellom glukose og glukuronsyre ble bestemt fra forholdet mellom intensiteten av fraksjoneringsstoppene på henholdsvis 205 og 207 i massespekteret. Det samme gjelder forbindelser som stammer fra 1 \rightarrow 4 bundet galaktose og galakturonsyre, der en kan bestemme mengdeforholdene ut fra intensiteten til henholdsvis 233 og 235 i massespekteret. Foretrede uronsyrer kan reduseres direkte til primære alkoholer vha NaBD₄, mens frie uronsyrer aktiveres med carbodiimide før reduksjon. Begge reaksjonene har 6,6-dideuteriosukker som produkt. Disse skilles fra nøytrale sukker ved GC-MS-analyser pga annen fragmentmasse ($M^+ + 2$)

Tabell 6.5 Fordelingen av de ulike monosakkaridene og deres bindingstyper til rækstraktene og fraksjonene etter ionebytterkromatografi på ANX Sepharose 4 Fast Flow. Verdiene er beregnet som AUC, og angis i prosent av totalt karbohydratinnhold.

Arabinose	TMERÅ	TMEN	TMES1	TM50WRÅ	TM50WN	TM50WS1	TM50WS2	TM100WRÅ	TM100WN	TM100WS1
T _f	22,7	23,5	24,6	14,05	17,2	19,85	11,36	7,95	28,07	15,15
1→2	spor	Spor	Spor	1,03	1,05	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor
1→3	Spor	Spor	Spor	1,03	1,05	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor
1→5	Spor	1,2	Spor	1,57	2,24	1,63	Spor	3,4	Spor	1,13
1→3,5	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor	1,95	4,77	Spor
1→2,5	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor	-	Spor	-
Sum	24,2	26	26,9	18,1	22,1	23,7	13,8	13,8	33,7	17,1

Rhamnose	TMERÅ	TMEN	TMES1	TM50WRÅ	TM50WN	TM50WS1	TM50WS2	TM100WRÅ	TM100WN	TM100WS1
T _p	4	1,34	2,86	Spor	1,01	2,98	2,81	Spor	Spor	Spor
1→2	-	5,8	4,53	4,53	Spor	9,25	10,75	3,62	-	10,24
1→2,3	-	-	-	Spor	Spor	Spor	Spor	-	-	-
1→2,4	-	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor	Spor	-	-	1,10
Sum	4	8	8,2	5,6	1,4	12,8	14,7	4,2	0	11,5

Xylose	TMERÅ	TMEN	TMES1	TM50WRÅ	TM50WN	TM50WS1	TM50WS2	TM100WRÅ	TM100WN	TM100WS1
T _p	1,3	2,3	2,5	1,3	1,6	8,0	2,1	4,1	2,4	6,3
Sum	1,3	2,3	2,5	1,3	1,6	8,0	2,1	4,1	2,4	6,3

Mannose	TMERÅ	TMEN	TMES1	TM50WRÅ	TM50WN	TM50WS1	TM50WS2	TM100WRÅ	TM100WN	TM100WS1
1→2	7,6	7,4	-	6,0	16,5	-	-	5,0	19,9	-
Sum	7,6	7,4	-	6,0	16,5	-	-	5,0	19,9	-

Glukose	TMERÅ	TMEN	TMES1	TM50WRÅ	TM50WN	TM50WS1	TM50WS2	TM100WRÅ	TM100WN	TM100WS1
T _p	20,18	3,52	-	1,44	2,86	-	-	Spor	9,56	-
1→4	18,42	6,68	-	24,47	25,89	-	-	33,54	30,14	-
1→3	-	-	-	-	7,66	-	-	-	-	-
Sum	38,6	10,2	-	25,9	36,4	-	-	34,5	39,7	-

Glukuronsyre	TMERÅ	TMEN	TMES1	TM50WRÅ	TM50WN	TM50WS1	TM50WS2	TM100WRÅ	TM100WN	TM100WS1
T _p	-	-	-	1,28	-	4,6	-	-	-	-
1→4	-	-	Spor	3,62	-	-	-	-	-	-
Sum	0	0	0	4,9	2,1	5,3	4,3	0	0	0

Galaktose	TMERÅ	TMEN	TMES1	TM50WRÅ	TM50WN	TM50WS1	TM50WS2	TM100WRÅ	TM100WN	TM100WS1
T _p	6,67	7,88	8,31	4,35	2,56	5,43	6,24	2,45	Spor	8,82
1→4	1,67	Spor	spor	2,91	6,01	0	0	Spor	3,85	Spor
1→3	1,18	Spor	2,58	3,0	Spor	4,60	5,27	Spor	-	2,45
1→6	5,99	6,07	4,21	3,05	5,45	4,01	1,33	Spor	-	1,61
1→3,6	3,3	Spor	4,24	4,64	1,19	8,85	4,24	Spor	-	2,39
1→3,4,6	5,51	1,94	3,27	3,27	2,90	4,52	1,43	Spor	-	1,05
Sum	24,3	17,5	22,6	21,2	19,1	27,4	16,7	4,3	4,3	14,9

Galakturonsyre	TMERÅ	TMEN	TMES1	TM50WRÅ	TM50WN	TM50WS1	TM50WS2	TM100WRÅ	TM100WN	TM100WS1
T _p	-	-	-	-	Spor	-	-	-	-	-
1→4	spor	28,7	37,60	16,6	-	22,7	50,1	27,1	-	47,25
1→3,4	-	-	2,30	-	-	-	-	-	-	2,85
Sum	0	28,7	39,9	16,6	0,9	22,7	50,1	27,1	0	50,1

Alle fraksjonene inneholder store mengder terminale monosakkarider, noe som kan tyde på en høy andel forgrenede pektiner.

Arabinogalaktan type I (AG-I)

AG-I er bygget opp av en hovedkjede bestående av β -1→4-bundet galaktan, med sidekjeder av arabinan som er bundet gjennom C3-posisjon i galaktoseenheter. TMERÅ, TM50WRÅ, TM50WN og TM100WN inneholder 1→4 bundet galaktose. TMEN, TMES1, TM100WRÅ og TM100WS1 inneholder spor av 1→4 bundet galaktose, men det er mengder < 1 % av monosakkaridinnholdet i prøven. Prøvene inneholder også 1→3,4,6 bundet galaktose. Dette kan være galaktose i hovedkjeden som er forgrenet i 3 og 6 posisjon. Alle prøvene inneholder denne bindingstypen, utenom TM100WN. TM100WRÅ, inneholder bare spor av 1→3,4,6 bundet galaktose.

Arabinogalaktan type II (AG-II)

AG-II har en hovedkjede av galaktan bundet sammen i enten C3-eller C6-posisjon. De høyst frekvente forgreningene består av 1→3,6-bundede galaktoseenheter. Alle fraksjonene utenom TM100WN inneholder 1→3 bundet galaktose, selv om det i TMEN, TM50WN og TM100WRÅ bare er i sporbare mengder. 1→6 bundet galaktose finnes også i alle fraksjonene, utenom TM100WN. I TM100WRÅ finnes 1→6 bundet galaktose bare i sporbare mengder. 1→3,6 bundet galaktose som finnes i sidekjedene til AG-II er også til stede i alle fraksjonene, utenom TM100WN. I TM100WRÅ og TMEN er 1→3,6 bundet galaktose bare i sporbare mengder. Dette kan indikere at alle fraksjonene utenom TM100WN inneholder AG-II.

Rhamnogalakturonan I (RG-I)

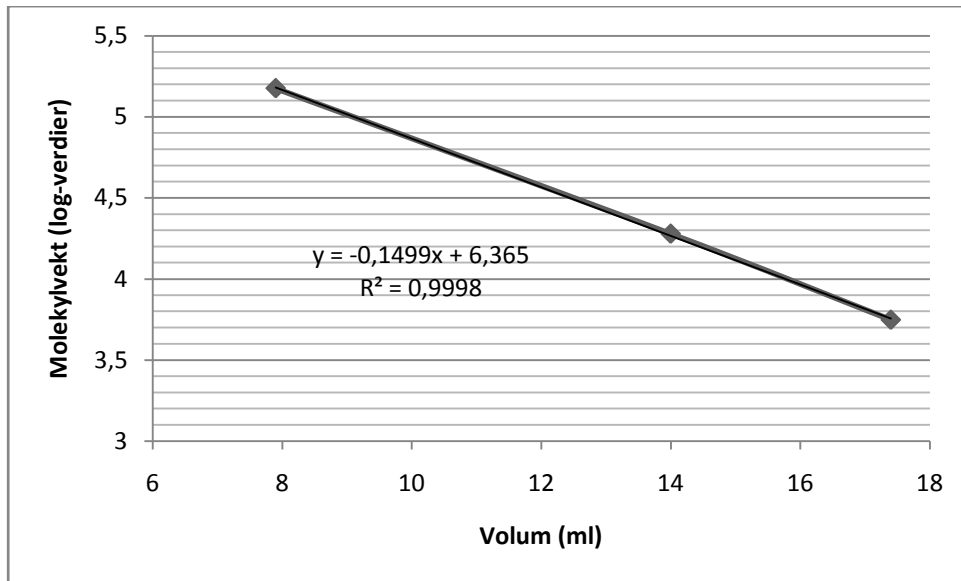
RG-I består av en hovedkjede med alternerende α -1 \rightarrow 2-L-rhamnose og α -1 \rightarrow 4-D-galakturonsyreenheter. Rhamnoseenheterne er forgreningspunkter i hovedkjeden, primært i C4-posisjon, men også i C3-posisjon. Alle prøvene, utenom TMERÅ og TM100WN, inneholder 1 \rightarrow 2 bundet rhamnose. Mange av prøvene inneholder også spor av 1 \rightarrow 2,3 og 1 \rightarrow 2,4 bundet rhamnose, som er forgreningspunktene i hovedkjeden. I TM50WN, TMERÅ og TM100WN som hadde lite eller ingenting 1 \rightarrow 2 bundet rhamnose, finner man også lite eller ingenting 1 \rightarrow 4 bundet galakturonsyre. Dette kan tyde på at disse fraksjonene ikke inneholder RG-I, men at resten av fraksjonene gjør det. Fraværet av 1 \rightarrow 4 bundet galakturonsyre kan også tyde på at disse fraksjonene heller ikke inneholder noen glatte områder.

Rhamnogalakturonan II (RG-II)

9-10 α -1 \rightarrow 4-D-galakturonsyreenheter utgjør hovedkjeden til RG-II, med fire forskjellige oligosakkaridsidekjerder bundet via C3- eller C4-posisjon. I disse sidekjedene finnes en rekke sjeldne sukker, som 2-O-metylfucose, 2-O-metylfucose, apiose, aceric acid, 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO) og 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid (DHA). Som nevnt under RG-I inneholder ikke fraksjonene TM50WN, TMERÅ og TM100WN 1 \rightarrow 4 bundet galakturonsyre som utgjør hovedkjeden til RG-II. Ingen av fraksjonene inneholder noen form for Fukose. Ut fra dette kan vi utelukke at TM50WN, TMERÅ, og TM100WN inneholder RG-II, mens de andre fraksjonene er det umulig å si noe mer om med de opplysningene som er tilgjengelig.

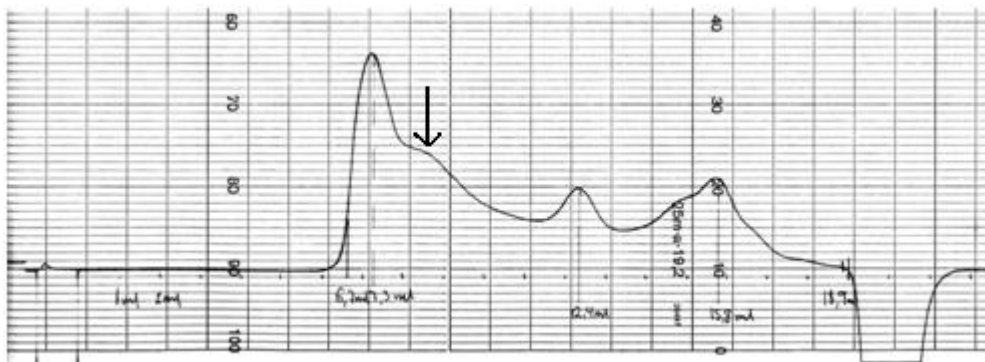
6.2.3 Molekylvektsdistribusjon

Molekylvektsdistribusjonen ble undersøkt ved hjelp av FPLC. Man ønsket å sammenlikne molekulvektsdistribusjonen til TM50WS1 og TM100WS1 med henholdsvis TM50WS1GalI og TM100WS1GalII, som har gjennomgått enzymatisk degradering. I tillegg til disse prøvene ble det applisert tre dekstranstandarter med kjent molekylvekt (M_w) under samme forhold. Det ble laget en lineær semilogaritmisk standardkurve ut fra toppmaksimum til hver dekstranstandard. Molekylvektsdistribusjon for prøvene ble estimert ved hjelp av funksjonen for en lineær regresjonslinje til kurven. Regresjonslinjen er svært godt tilpasset til linjen, med R^2 på 0,9998. Se figur 6.4.

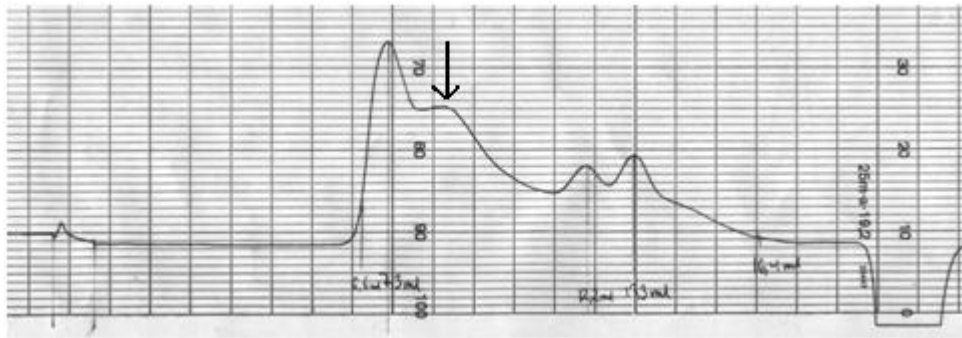


Figur 6.4 Standardkurve for FPLC av dekstraner med molekylvekt Mw 5600 Da, 19 000 Da og 150 000 Da plottet semilogaritmisk mot elueringsvolumet til toppmaksimum.

De fleste pektintype polysakkarider er polydisperse, det var derfor forventet at også disse prøvene skulle være polydisperse. Det viste seg å stemme. Prøvene er polydisperse med flere topper, men uten grunnlinjeseparasjon. På grunn av manglende grunnlinjeseparasjon er molekylvekstdistribusjonen kun beregnet ut fra toppmaksimum

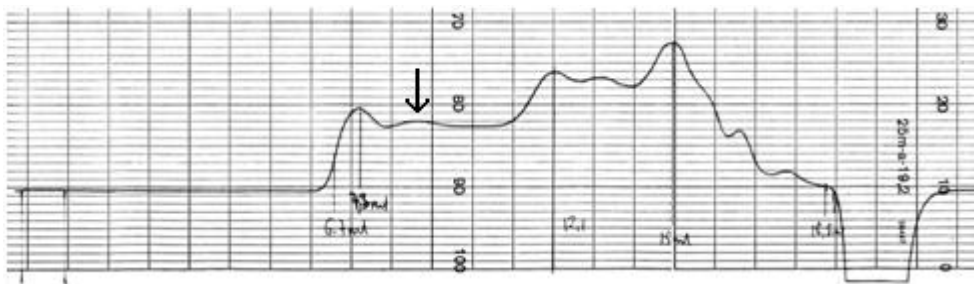


Figur 6.5 Kromatogram over molekylvekstdistribusjonen til TM50WS1. Pilen viser hvor hovedtoppen kommer ut.

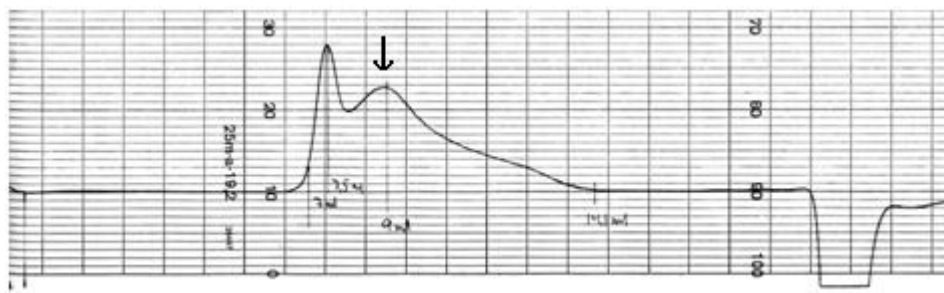


Figur 6.6 Kromatogram over molekylvekstdistribusjon til TM50WS1GalI. Pilen viser hvor hovedtoppen kommer ut.

Sammenlignes molekylvekstdistribusjonen til TM50WS1 og TM50WS1GalI kommer første toppen ved samme tidspunkt i begge prøver. Dette er ikke hovedtoppene i prøvene, men skyldes høyst sannsynlig en opphopning av molekyler som er for store til å bli separert på kolonnen. Disse molekylene kommer ut sammen med væskefronten V_0 . Det som sannsynligvis er hovedtoppene er markert med en pil i figur 6.5 og 6.6. Hovedtoppen kommer etter ca 8,6 ml hos TM50WS1 og etter ca 8,8 ml hos TM50WS1GalI. Dette kan tyde på at hovedtoppen til TM50WS1GalI inneholder molekyler med litt mindre molekylvekt enn molekylene i hovedtoppen til TM50WS1.



Figur 6.7 Kromatogram over molekylvekstdistribusjonen til TM100WS1. Den største toppen er avmerket med en pil.



Figur 6.8 Kromatogram over molekylvekstdistribusjonen til TM100WS1GalI. Hovedtoppen er avmerket med en pil.

Forskjellen i molekylvekstdistribusjonen er større hos TM100WS1 og TM100WS1GalI. På grunn av lite tilgjengelig stoff ble det kun applisert 0,5 mg av TM100MS1GalI, i motsetning til de andre fraksjonene, hvor det ble applisert 1 mg. Også her er en stor del av molekylene er for store til å bli separert på kolonnen, og kommer ut med væskefronten V_0 . Den største toppen hos TM100WS1 ligger litt til venstre for den største toppen hos TM100WS1GalI. Dette indikerer at TM100WS1 har molekyler med større molekylvekt i sin største topp, enn det TM100WS1GalI har. TM100WS1 er distribuert over et større molekylvektsområde enn TM100WS1GalI. Molekyler kan ha blitt fjernet fra TM100WS1GalI ved opprensing på gelfiltreringskolonne etter enzymatisk degradering med endo-polygalakturonanase.

Tabell 6.6 Estimert molekylvekstdistribusjon

	Fra M_w (Da.)	Til M_w (Da.)	Toppmaksimum M_w (Da.)
TM50WS1	229 440	3 403	119 086
TM50WS1GalI	237 498	8 065	111 142
TM100WS1	229 440	3 522	115 045
TM100WS1GalI	206 871	17 840	103 729

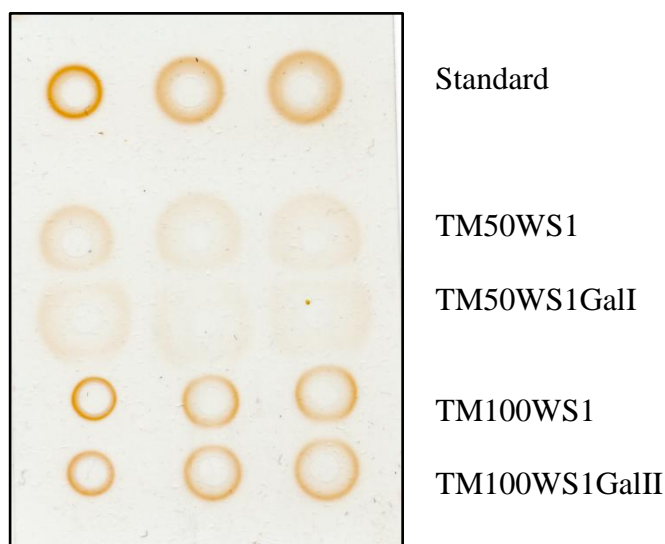
Molekylvekten til den største dekstranstandard som ble eluert, var 150 000 Da. De estimerte molekylvektene i prøvene strekker seg fra 237 498 Da til 3 522 Da. De største estimerte molekylvektene er altså høyere enn molekylvekten til den største dekstranstandard som ble brukt til å lage standardkurven. Det er derfor en viss usikkerhet forbundet til disse resultatene.

Mange av molekylene kom også ut med væskefronten, uten først å ha blitt separert på kolonnen. I ettertid ser man at det med fordel kunne ha blitt brukt en kolonne med større eksklusjonsverdi. Slike kolonner finnes ikke kommersielt tilgjengelig for FPLC - systemet. Man kunne eventuelt ha pakket kolonnen selv, men det ble det ikke tid til.

6.2.4 Innhold av ketoser i prøven

Ved svak hydrolyse forblir ketoser intakte uten å konvertere til aldoser. Ved tilsetning av urea-HCl vil urea-HCl reagere med ketongrupper, og danne et blåfarget kompleks. Ved svak hydrolyse av TM50WN, med påfølgende tilsetning av urea-HCl, ble det detektert en blå farge. Dette indikerer at prøven inneholder ketoser, høyst sannsynlig fruktaner.

6.2.5 Identifikasjon av arabinogalaktan II ved hjelp av Yarivreagens



Figur 6.9 Gelbondfilm med utfelt arabinogalaktan II, med mengdene 2, 4, og 6 µl av standard øverst.

Fire forskjellige fraksjoner ble tatt med i Yariv-testen, TM50WS1, TM50WS1GalI, TM100WS1 og TM100WS1GalII. Det var ønskelig å inkludere TM100WS1GalI i denne testen, men det var dessverre ikke nok tilgjengelig stoff til at dette lot seg gjøre. TM100WS1GalII ble tatt med i testen, selv om det ikke er foretatt noen andre analyser av denne fraksjonen.

Som vist i figur 6.9 feller alle fraksjonene ut med Yariv-reagenset. Dette betyr at alle fraksjonene inneholder områder med AG-II. Ringene som er avsatt rundt brønnene med TM50WS1 og TM50WS1GalI er større enn ringene rundt brønnene med TM100WS1 og

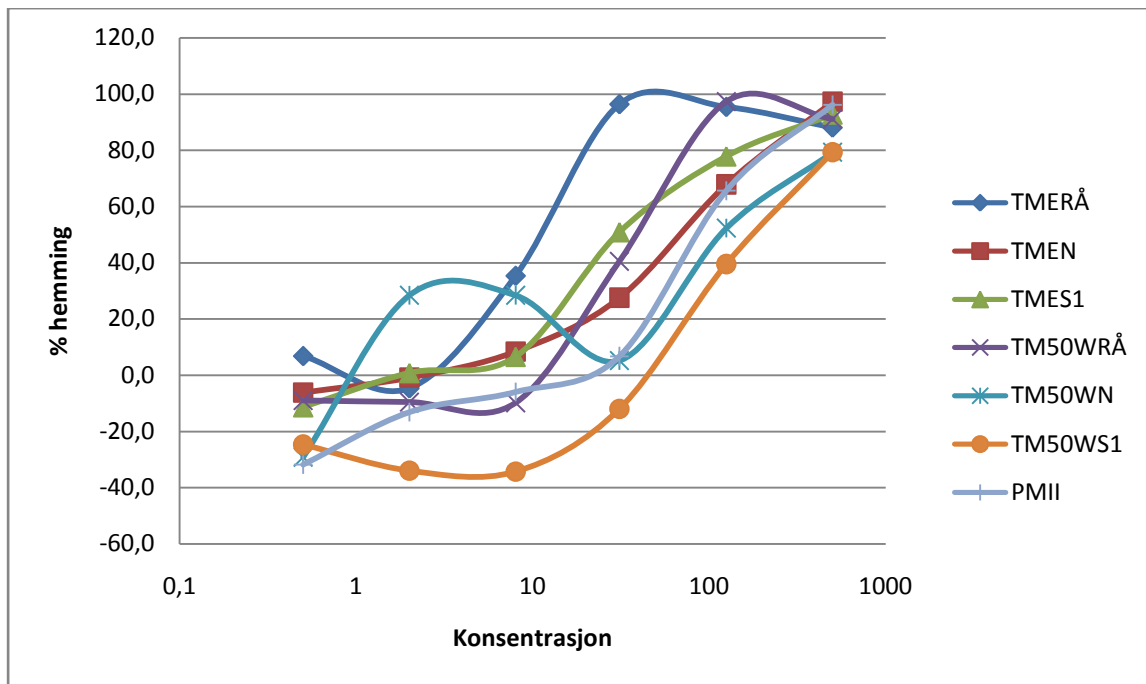
TM100WS1GalII. Dette tyder på at TM50WS1 og TM50WS1GalII har større innhold av AG-II enn TM100WS1 og TM100WS1GalII. Ringene rundt TM50WS1 og TM50WS1GalII har mye lavere intensitet enn ringene rundt standarden, TM100WS1 og TM100WS1GalII. Intensiteten på den utfelte fargen har ikke direkte sammenheng med hvor mye AG-II det er i prøven. Det er først og fremst diameteren på den diffundererte ringen som indikerer hvor mye AG-II som er til stede i prøven. Den lave fargeintensiteten kan skyldes at AG-II kan reagere med Yariv-reagenset på flere forskjellige måter. Det kan også skyldes konsentrasjonen av Yariv-reagens i gelen. Dersom forsøket skulle gjennomføres på nytt, ville det vært ønskelig å øke konsentrasjonen av Yariv-reagens i gelen.

I kapittel 6.2.2 ser vi at TM50WS1 inneholder en forholdsvis større andel 1→3,6 bundet galaktose enn TM100WS1. 1→3,6 bundet galaktose finnes i AG-II-områder og dette stemmer godt med resultatene fra Yariv-testen hvor det ser ut som om TM50WS1 har større andel AG-II enn TM100WS1.

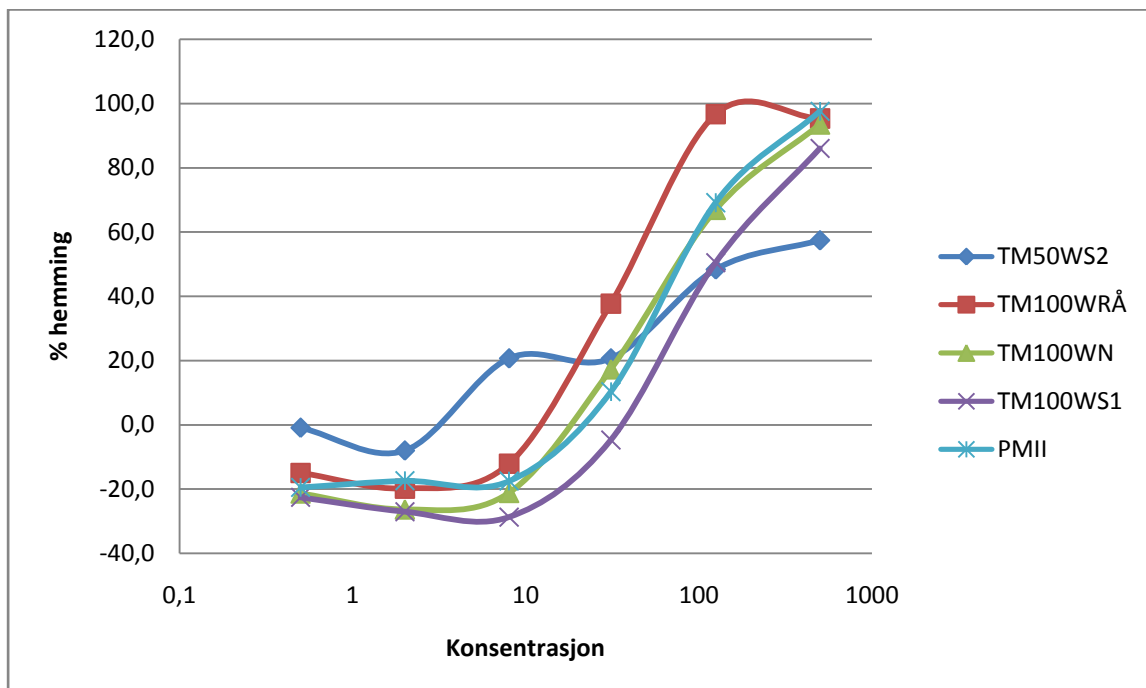
6.3 Biologisk aktivitet

6.3.1 Komplementfikseringstest

Komplementfikseringstesten er en måte å undersøke fraksjoners biologiske aktivitet. Ved måling av *in vitro* effekter på det humane komplementsystemet testes det om prøvene kan påvirke enkelte komplementfaktorer, som igjen fører til redusert evne til å hemolysere røde blodceller som er dekket med antistoff. I testen måles aktiviteten som prosent inhibering av hemolyse. IC₅₀-verdien er den konsentrasjonen av en prøve som hemmer 50 % av hemolysen. Testen utføres i et biologisk system og resultatene kan variere fra gang til gang. Derfor bruker man også fraksjon II av *Plantago major* L., (PM II) som en positiv kontroll. Tidligere tester har vist at PM II har stor aktivitet i komplementsystemet. Testen er ikke i stand til å skille mellom aktivering og hemming i komplementsystemet. Testen ble utført tre ganger på rækstraktene og ekstraktene som har blitt eluert på ionebytterkolonne. Den ene gangen var forsøket mislykket, og resultatene herifra tas derfor ikke med i denne diskusjonen.



Figur 6.10 Komplementfikserende aktivitet



Figur 6.11 Komplementfikserende aktivitet

Tabell 6.7 IC_{50} verdier tilhørende figur 6.9 og 6.10

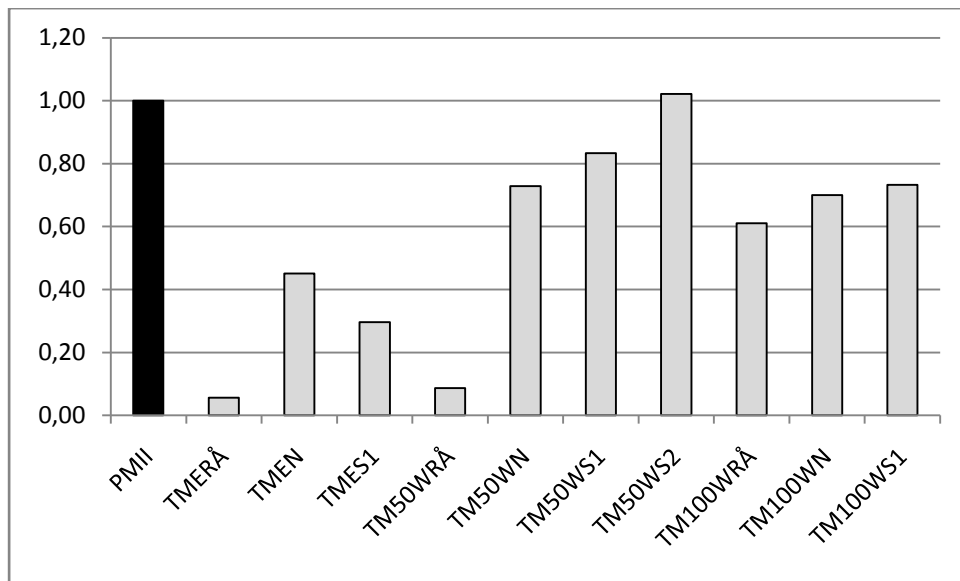
Fraksjon	IC_{50} -verdi ($\mu\text{g/ml}$)	Fraksjon	IC_{50} -verdi ($\mu\text{g/ml}$)
TMERÅ	11	TM50W2	151
TMEN	69	TM100WRÅ	43
TMES1	30	TM100WN	76
TM50WRÅ	40	TM100WS1	123
TM50WN	114	PM II	78
TM50WS1	197		
PM II	84		

Figur 6.10 og 6.11 viser den komplementfikserende aktiviteten til rækstraktene og ekstraktene som har blitt eluert på ionebytterkolonne. Tabell 6.7 viser de tilhørende IC_{50} -verdiene.

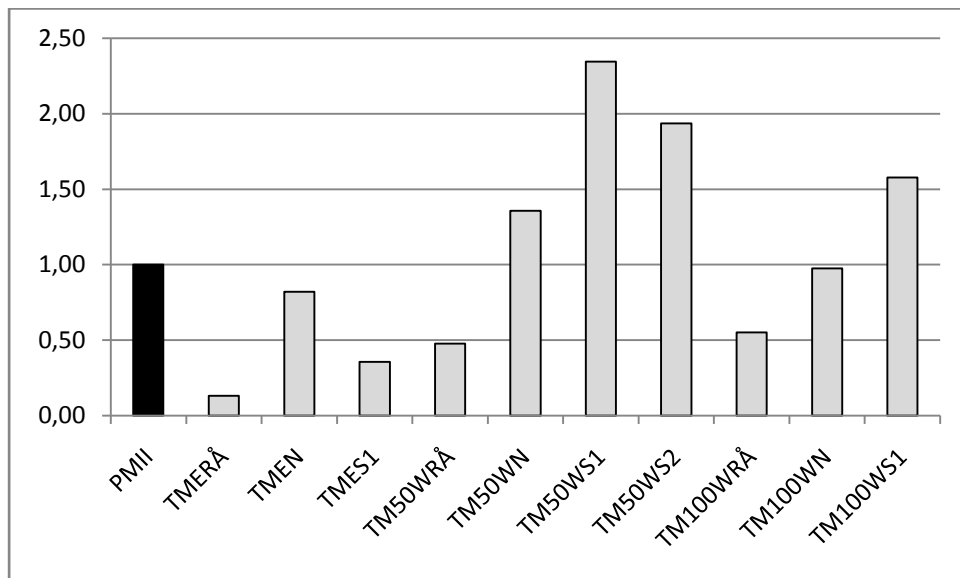
Dersom man setter IC_{50} -verdien til PM II til 1, og regner ut det relative forholdet, kan man sammenlikne resultatene fra forskjellig forsøk. Figur 6.12 viser resultatene fra den første gjennomføringen av komplementtesten, som relative IC_{50} -verdier. Alle fraksjonene utenom TM50WS2 viser større aktivitet enn PMII. Etanolfraksjonene og det vandige rækstraktet ekstrahert ved 50 °C er de mest aktive fraksjonene.

Figur 6.13 viser resultatene fra den andre gjennomføringen av komplementtesten, som relative IC_{50} -verdier. TM50WN, TM50WS1, TM50WS2 og TM100WS1 har lavere aktivitet enn PM II. Sammenlikner man aktiviteten til fraksjonene i forhold til hverandre, viser de samme fraksjonene høy aktivitet i begge gjennomføringene. Alle etanolfraksjonene, samt TM50WRÅ og TM100WRÅ har høy aktivitet i komplementsystemet i begge gjennomføringene. De fraksjonene som har blitt rensset opp ved hjelp av ionebytterkromatografi viser lavere aktivitet i komplementfikseringstesten enn rækstraktene. Det kan tyde på at noe som har betydning for aktiviteten i komplementsystemet har blitt fjernet i renselsesprosessen. TM100WS1 er den mest aktive av de sure vandige fraksjonene.

I den første gjennomføringen ble PM II- veid ut og løsningen tillaget i laboratoriet. I andre gjennomføring ble det benyttet en ferdiglaget standardløsning som ble fortynnet. Dette kan ha hatt innvirkning på resultatet. Det ble også benyttet blod fra forskjellige sauer, i de to gjennomføringene av testen. Usikkerhet ved utveiling av små mengder som 1 mg kan også ha innvirkning på resultatet.



Figur 6.12 IC₅₀-verdier relative til PM II, forsøk nummer 1

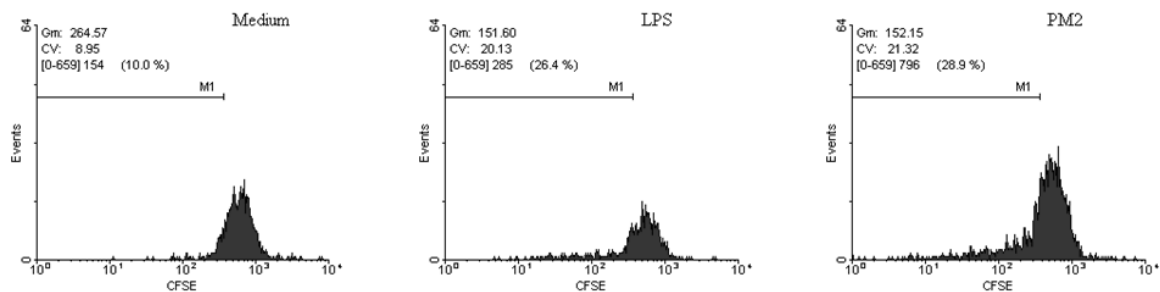


Figur 6.13 IC₅₀-verdier relative til PM II, forsøk nummer 2

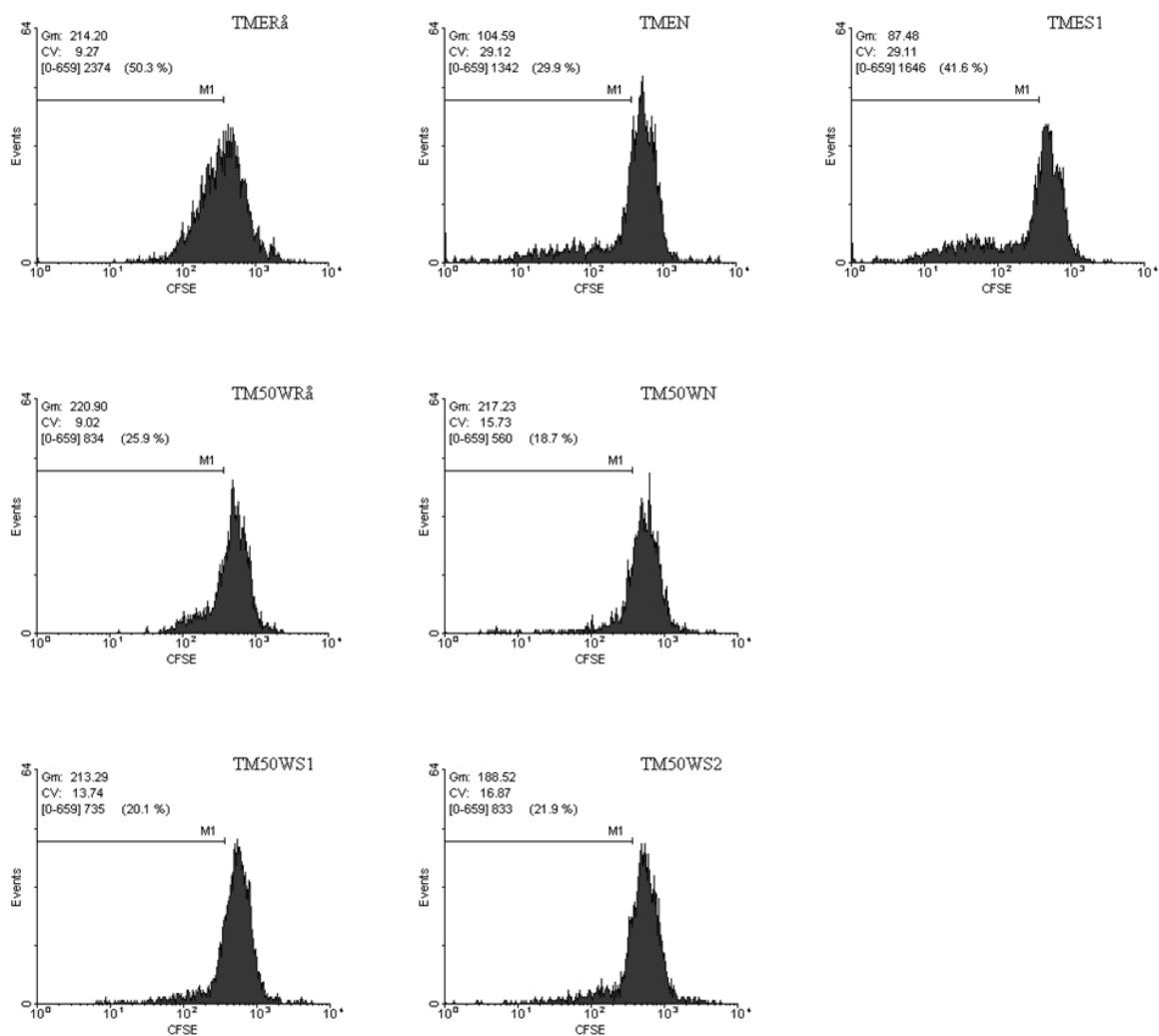
6.3.2 Indusering av B-celleproliferasjon

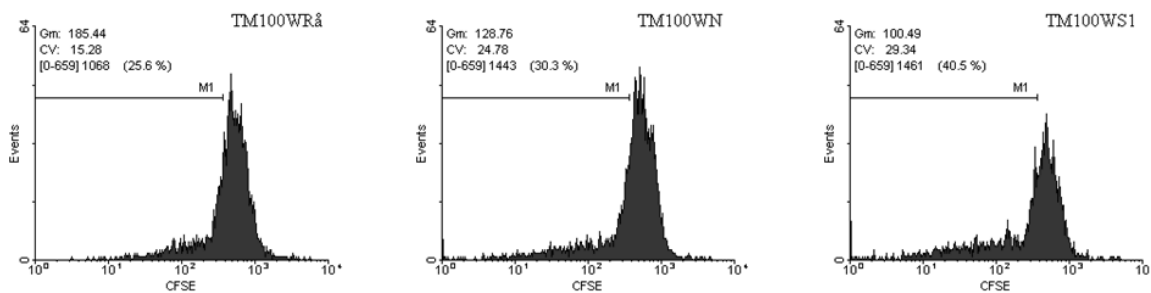
Råekstraktene og ekstraktene som har blitt eluert på ionebytterkolonne ble testet for evnen til å indusere B-celleproliferasjon. Resultatet ble sammenlignet med medium alene som negativ kontroll. Lipopolysakkarid (LPS) 500ng/ml og PM II 100 µg/ml ble brukt som positiv kontroll. Når B-cellene prolifererer vil man få flere celler med fargestoff i, men hver dattercelle vil ha halvparten av morcellens fargestoff. Mange celler med lavt

fargestoffinnhold tyder altså på høy B-celleproliferasjon. Resultatet forteller hvor stor prosentandel av B-cellene som har en fargestoffintensitet mellom 0 og 659. Denne avleses som arealet under kurven.

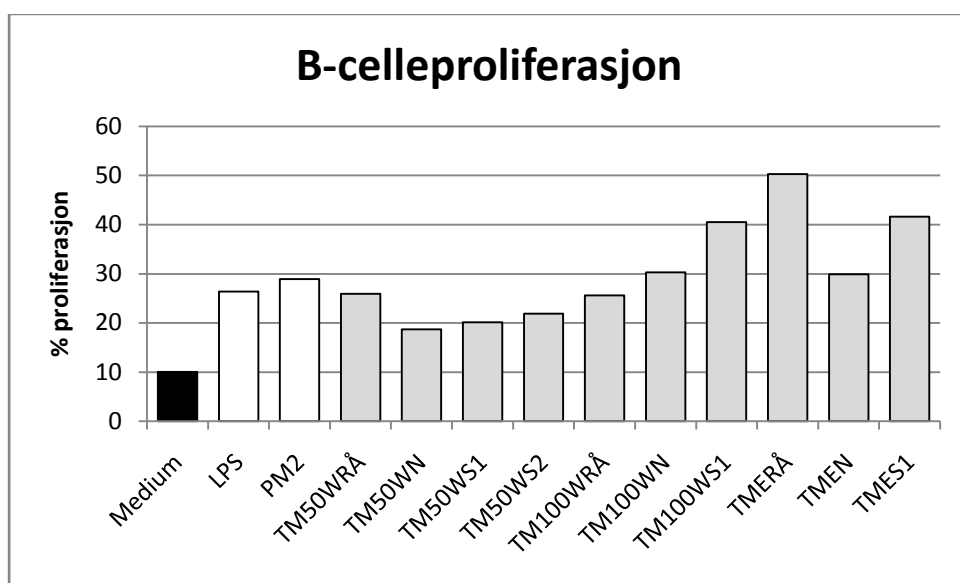


Figur 6.14 Medium og de positive kontrollenes evne til å aktivere B-celleproliferasjon





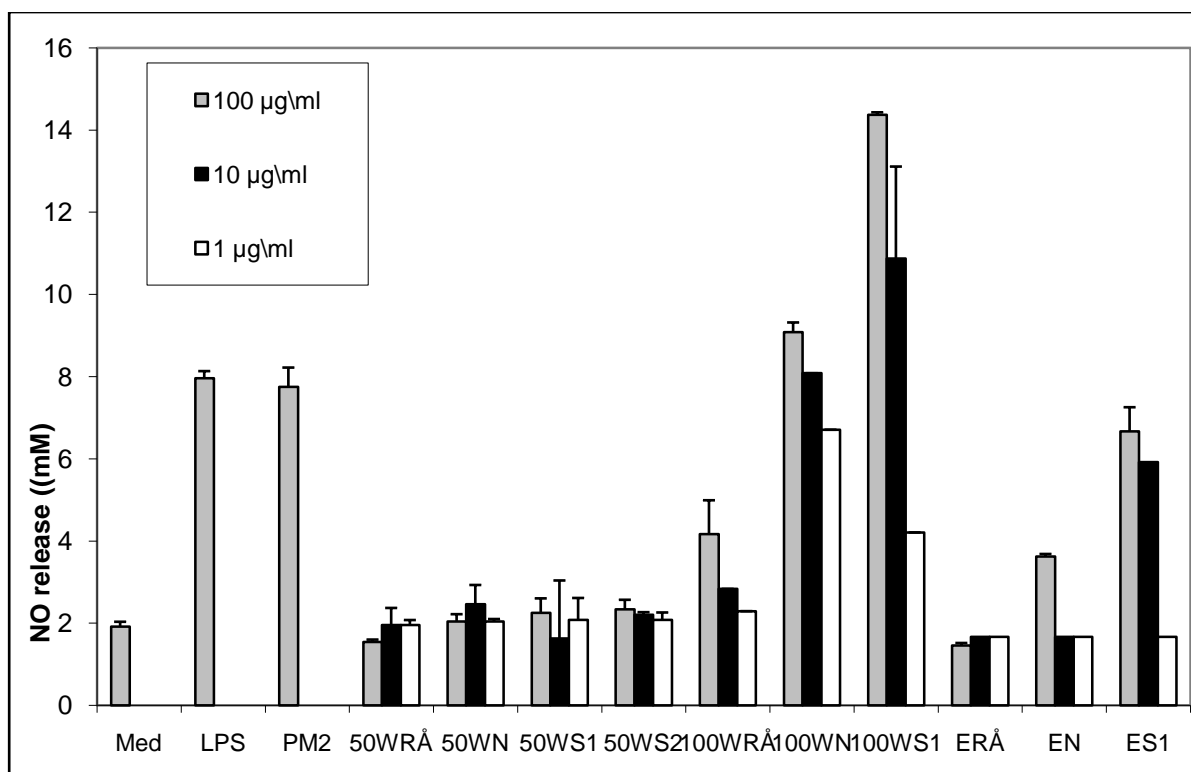
Figur 6.15 Råekstraktenes og fraksjonene som har blitt eluert på ionebytterkolonne sin evne til å aktivere B-celleproliferasjon



Figur 6.16 Prosentvis B-celleproliferasjon sammenliknet med medium som negativ kontroll, og LPS og PM II som positiv kontroll.

Figur 6. 14 og 6.16 viser at den negative kontrollen, medium alene, stimulerer til 10 % B-celleproliferasjon. De to positive kontrollene, LPS og PM II, stimulerer til henholdsvis 26,4 og 28,9 % B-celleproliferasjon. Figur 6.15 og 6.16 viser at alle fraksjonene er mer aktive enn den negative kontrollen, det vil si at alle fraksjonene har evnen til å indusere B-celleproliferasjon. TMERÅ er den mest aktive fraksjonen, etterfulgt av TMES1 og TM100WS1. Generelt har fraksjonene som kommer fra 50 °C vannekstraktet lavest aktivitet. TM100WS1 er den mest aktive av de sure, vandige fraksjonene.

6.3.3 NO-frigjøring fra makrofager

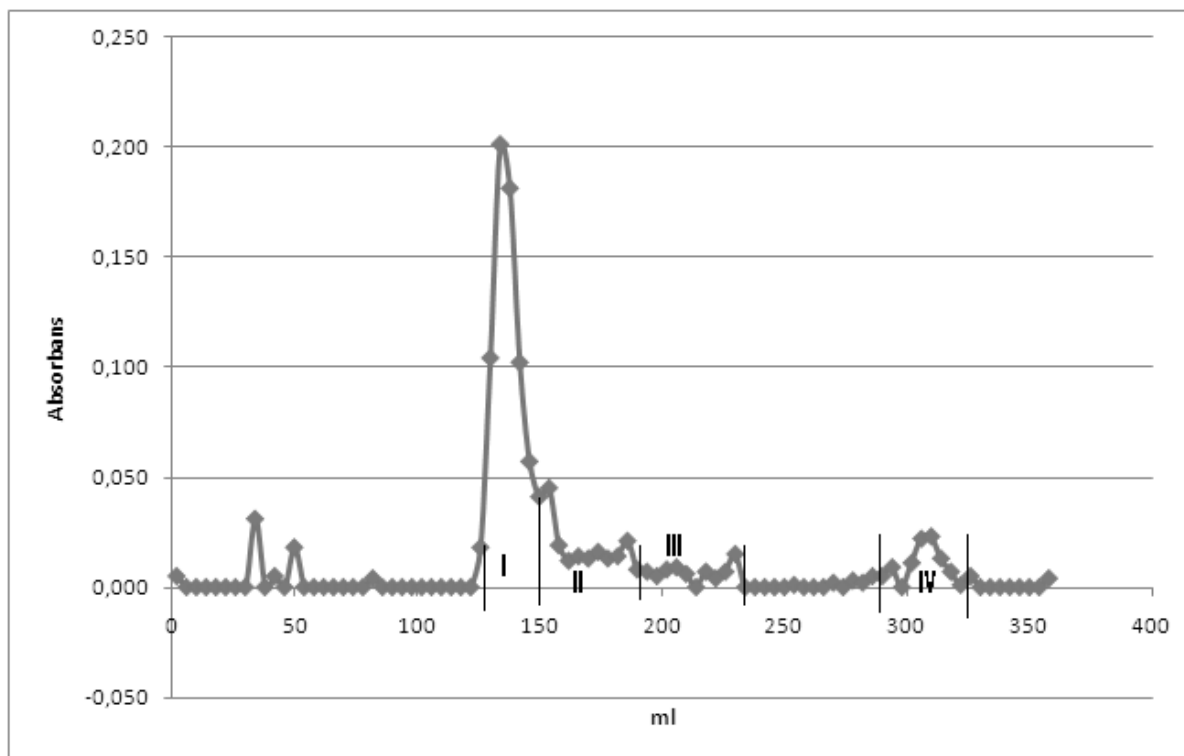


Figur 6.17 NO-frigjøring fra makrofager

Det ble testet om rækstraktene og fraksjonene som er eluert på ionebytterkolonne påvirker NO-frigjøringen fra makrofager. 1 µg/ml, 10 µg/ml og 100 µg/ml av hver fraksjon ble testet. Medium ble brukt som negativ kontroll. LPS og PM II er positive kontroller. Alle fraksjonene fra 50 °C vannekstrak har NO-frigjøring på samme nivå som den negative kontrollen, i alle konsentrasjoner. 100 °C vannfraksjonene er mer aktive. Makrofager som blir påvirket av TM100WS1 har den største NO-frigjøringen, mye høyere enn de som blir påvirket av PM II og LPS i konsentrasjon 100 µg/ml. TM100WN i konsentrasjon 100 µg/ml har en frigjøring på lik linje med LPS og PM II. Den sure etanolfraksjonen TMES1 har den høyeste frigjøringen av NO blant etanolfraksjonene. TM100WS1, TM100WN og TMES1 ser altså ut til å påvirke makrofagene til å skille ut mer NO. NO-frigjøringen ser ut til å være konsentrasjonsavhengig, responsen øker med økende konsentrasjon.

6.4 Strukturoppklaring etter enzymatisk degradering med endo-polygalakturonanase

6.4.1 Gelfiltrering Bio-Gel P-30



Figur 6.18 Karbohydratelueringprofilen til TM100WS1 etter degradering med endo-polygalakturonanase. I, II, III og IV tilsvarer fraksjonene TM100WS1GalI, TM100WS1GalII, TM100WS1GalIII og TM100WS1GalIV

Da resultatet av utført monosakkaridanalyse, metylering, komplementfikseringstest, indusering av B-celleproliferasjon og måling av NO-frigjøring fra makrofager forlås, ble det besluttet å gå videre med to fraksjoner til enzymatisk degradering (TM50WS1 og TM100WS1). Den enzymatiske degraderingen ble foretatt med endo-polygalakturonanase. Etter dette ble løsningene applisert på en Bio-gel P-30 gelfiltreringskolonne for å separere de hårte områdene fra resten av prøven. Det ble eluert med destillert vann, og etter karbohydratelueringprofilen ble det delt inn i 6 forskjellige fraksjoner, TM50WS1GalI, TM50WS1GalII, TM100WS1GalI, TM100WS1GalII, TM100WS1GalIII og TM100WS1GalIV. Se figur 6.18 for fraksjonsinndelingen til TM100WS1Gal. Etter frysetørking ble det klart at det var for lite materiale av TM50WS1GalII, TM100WS1GalII, TM100WS1GalIII og TM100WS1GalIV til å foreta videre undersøkelser, se tabell 6.8. TM50WS1GalI og TM100WS1GalI ble analysert med tanke på

monosakkaridsammensetning, bindingsforhold, og aktivitet i komplementfikseringstesten, samt at TM50WS1GalI også ble testet i Yariv-testen.

Tabell 6.8 Utbytte etter enzymatisk degradering og gelfiltrering

Fraksjon	Utbytte (mg)	Utbytte (%)
TM50WS1GalI	10,5 mg	35,1
TM50WS1GalII	-	-
TM100WS1GalI	2,9 mg	9,6
TM100WS1GalII	1,4 mg	4,7
TM100WS1GalIII	0,7 mg	2,3
TM100WS1GalIV	0,4 mg	1,3

6.4.2 Monosakkaridanalyse

Tabell 6.9 Monosakkaridsammensetningen til TM50WS1GalI og TM100WS1GalI

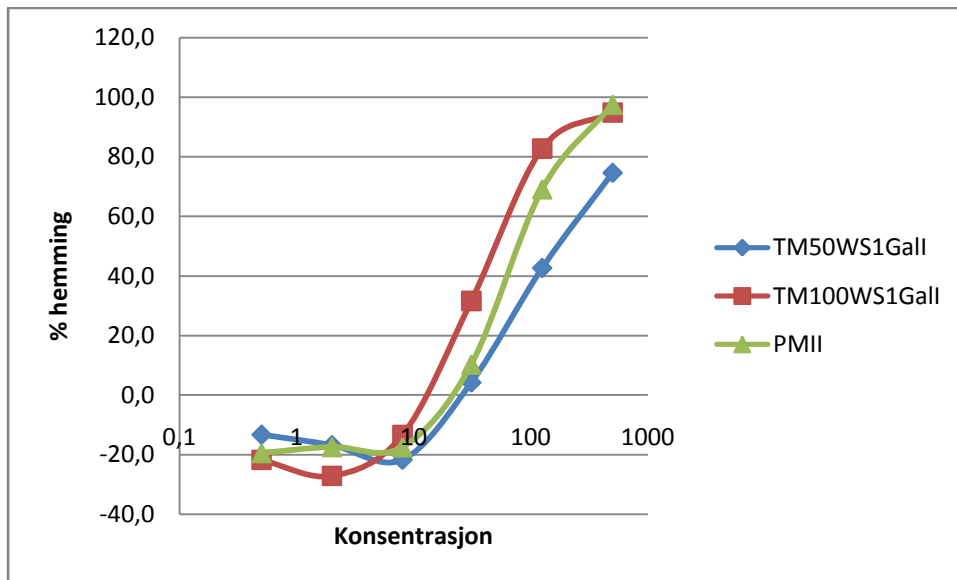
	TM50WS1galI	TM100WS1galI
Arabinose	28,1%	36,2%
Rhamnose	13,3%	11,4%
Fukose	-	-
Xylose	1,2%	5,6%
Mannose	-	-
Galaktose	37,2%	31,9%
Glukose	-	-
Glukuronsyre	6,6%	5,4%
Galakturonsyre	13,6%	9,4%
Sum	99,9%	100,0%

Monosakkaridsammensetningen i fraksjonene etter enzymdegradering vises i tabell 6.9. Monosakkaridsammensetningen til TM50WS1GalI er ganske lik sammensetningen til TM50WS1. TM50WS1 har en galakturonsyreandel på 22,7 %, etter enzymdegradering reduseres denne til 13,6 %. Andelen galaktose øker, fra 27,4 % til 37,2 %. Prøvene er degradert med endo-polygalakturonanase som spalter glykosidbindinger i områder med ikke-esterifisert homogalakturonan. De glatte områdene som består av 1→4 galakturonsyreenheter, og bindingene i dette området kan ha blitt spaltet bort.

Etter enzymatisk degradering er galakturonsyreandelen kraftig redusert fra 50,1 % i TM100WS1 til 9,4 % i TM100WS1GalI. Galaktoseandelen har økt fra 14,9 % til 31,9 %. Som nevnt ovenfor kan dette skyldes enzymatisk avspalting av områder med 1→4 galakturonsyreenheter.

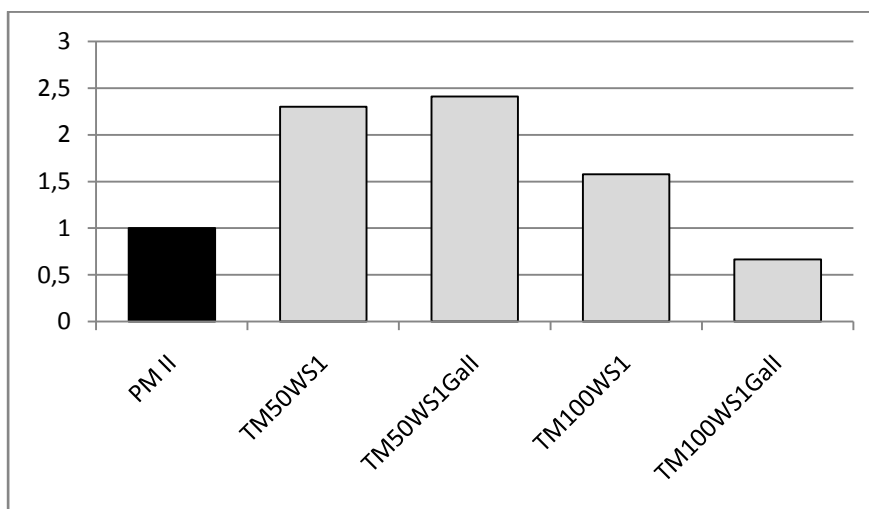
Etter enzymatisk degradering er andelene rhamnose og galakturonsyre i de enkelte fraksjonene tilnærmet like store. Dette kan tyde på at det er blitt isolert områder med rhamnogalakturonan I, hvor hovedkjeden består av alternerende α -1 \rightarrow 2-L-rhamnose og α -1 \rightarrow 4-D-galakturonsyreenheter. (Paulsen og Barsett 2005)

6.4.3 Komplementfikseringstesten



Figur 6.19 Komplementfikserende aktivitet etter enzymdegradering og gelfiltrering

Etter enzymatisk degradering ble prøvene testet en gang i komplementfikseringstesten, se figur 6.19. Sammenlignet med PM II har TM100WS1GalI høyere aktivitet, og TM50WS1GalI lavere aktivitet.



Figur 6.20 Komplementfikserende aktivitet relativt til PM II

Dersom man setter den PM II til 1, og regner ut den relative aktiviteten kan man sammenlikne aktiviteten før og etter enzymatisk degradering, se figur 6.20. TM100WS1GalI har høyere aktivitet i komplementfikseringstesten enn TM100WS1. TM50WS1GalI har tilnærmet lik aktivitet som TM50WS1. Økningen i aktivitet etter enzymdegradering av TM100WS1 kan skyldes at TM100WS1Gal inneholder en større andel hårete områder. De fleste antikomplementære arabinogalaktaner har blitt karakterisert som AG-II. (Yamada og Kiyohara 1999)

6.5 Videre studier

Under arbeidet med denne masteroppgaven har det dukket opp flere funn som kunne vært interessante å studere videre, men som på grunn av tidsaspektet og/eller mangel på tilgjengelig stoff dessverre ikke har latt seg gjøre.

Det ble valgt å studere fraksjonene TM50WS1 og TM100WS1 litt nærmere. TM100WS1 har vist god evne til å indusere B-celleproliferasjon, og er den fraksjonene som får makrofagene til å frigi mest NO. I den første gjennomføringen av komplementfikseringstesten viste både TM100WS1 og TM50WS1 større aktivitet enn PMII. Dette var bakgrunnen for at nettopp disse to fraksjonene ble valgt.

Det kunne også vært interessant å gå videre med etanolfraksjonene. Råekstraktet har størst aktivitet i komplementfikseringstesten og størst evne til å indusere B-celleproliferasjon. Ved videre opprensing er aktiviteten noe lavere i de nevnte testene, men den er absolutt til stede. TMERÅ inneholder mer upolare og lavmolekylære forbindelser, og skiller seg også utseendemessig fra de andre råekstraktene etter frysetørking.

Bindingsforhold og tester for biologisk aktivitet til de to enzymdegraderte fraksjonene TM50WS1GalI og TM100WS1GalI skulle gjerne vært undersøkt. Dette var det dessverre hverken tid eller nok stoff tilgjengelig til å utføre.

Alle nøytrale og sure fraksjoner kunne ha blitt rensset videre opp ved hjelp av preparativ gelfiltrering. TM100S1 peker seg ut som en fraksjon det kan være interessant å utføre mer studier på.

Bare ett fåtall av fraksjonene ble testet med Yariv-testen. Denne kunne ha blitt utført på alle fraksjonene, da med større konsentrasjon av Yariv-reagens enn 1 µg/µl.

7. ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER I MALI

7.1 Etnofarmakologi

Etnofarmakologi er en underdisiplin av etnobotanikk. Akkurat som i etnobotanikken er man interessert i moderne og tidligere bruk av planter i primitive samfunn. Innen etnofarmakologi er man spesielt på jakt etter den medisinske bruken av plantene. Denne kunnskapen brukes til å lette letingen etter nye bioaktive legemiddelsubstanser. (Schultes 1993)

Omtrent halvparten av de legemidlene som finnes på markedet i dag er substanser som finnes i naturen, eller derivater av disse. Noen eksempler er morfin som er isolert fra opiumsvalmuen *Papaver somniferum*, og atropin fra *Atropa belladonna*. (Iwu 2002)

Etnofarmakologi er et fagfelt som krever samarbeid mellom flere disipliner. Alt fra sosialantropologer til botanikere, farmakognoster, medisinere og analysepersonell involveres når planter skal identifiseres, høstes og analyseres med tanke på struktur og biologisk aktivitet.

7.2 Mali



Figur 7.1 Kart over Mali (U.S._Department_of_Transportation 2007)

Landet Mali ligger i Vest-Afrika, med et innbyggertall estimert til å være 12,7 millioner mennesker. I utstrekning er landet nesten 4 ganger så stort som Norge. Ørkenen Sahara dekker store landområder nord i landet og gjør disse ubeboelige. På grunn av det tørre og varme klimaet, og landets lokalisering uten kystlinje, bor de fleste innbyggerne langs elva Niger som renner gjennom landet. Landbruk og fiske er hovedgeskjeften til 80 % av arbeidsstyrken. (CIA 2009)

Fattigdom er stort problem i Mali. På målskalaen for menneskelig utvikling som ble publisert av FN i 2008 ligger Mali som det 12. fattigste landet i verden. (UNDP 2008) En gjennomsnittelig kvinne føder 7,29 barn, og barnedødeligheten er høy. 102, 05 av 1000 levende fødte barn dør innen de fyller ett år. Mange barnefødsler og lav levealder setter sine spor. I 2009 er det estimert at 48,3 % av befolkningen i landet er under 15 år. (CIA 2009)

Den største dødsårsaken blant befolkningen i Mali er infeksjoner i de nedre luftveiene, etterfulgt av sykdommer med diaré, og malaria. (WHO 2006) Med lav legedekning, og dårlig tilgang på konvensjonell medisin må andre krefter involveres for å gi befolkningen et

tilfredsstillende helsetilbud. I Mali tar tradisjonelle healere seg av mange av de primære helsebehovene i befolkningen.

7.3 Tradisjonell medisin i Mali

Tradisjonell medisin blir definert som summen av kunnskap, ferdigheter og praksis basert på teorier, tro og erfaring som finnes opprinnelig i forskjellige kulturer, og som brukes til å opprettholde helse, men også til å forebygge, diagnostisere, forbedre og behandle fysisk og mental sykdom.(WHO 2008)

Innbyggerne i Mali benytter både tradisjonell og konvensjonell medisin. Hos majoriteten av innbyggerne står tradisjonell medisin sterkest når de skal behandle helseproblemer. (Diallo 2000) Det kan være flere årsaker til dette. Tilgangen på leger i Mali er lav. I 2004 fantes det bare 1053 leger i landet.(WHO 2006) En lege skal altså i gjennomsnitt betjene nærmere 12 000 pasienter. I tillegg er prisen også mange ganger avgjørende for hvilken behandling som blir valgt. Konvensjonelle legemidler koster mer enn behandling hos en tradisjonell healer.

Département de la Médecine Traditionnelles (DMT) i Mali samarbeider med WHO om forskning på tradisjonell medisin. DMT samarbeider igjen med tradisjonelle healere over hele Mali og sørger for at tradisjonell medisin komplementerer den konvensjonelle medisinen. Dette samarbeidet har båret frukter, og DMT har utviklet 12 såkalte MTAer (Medicamentes Traditionnelles Améliorés). MTAene er forbedrede formuleringer av tradisjonelle medisiner som er blitt testet med tanke på toksisitet. 7 av disse er på listen over essensielle legemidler i Mali, og selges på apotek over hele landet.(Diallo 2000)

7.4 Feltarbeid

Det ble utført feltarbeid i Mali i perioden 24. november – 13. desember 2008. Intervjuene ble foretatt i forskjellige områder av Mali, og totalt 78 healere ble intervjuet.

Healerne ble spurt om indikasjon for bruk, plantedel, tilbereding, dosering og administrasjon av de følgende plantene: *Parkia biglobosa*, *Terminalia macroptera*, *Cola cordifolia* og *Ximenia americana*. Healerne ble også spurt om bivirkninger av behandlingen, men de fleste svarte at de ikke bruker planter som bekjemper kroppen. Dersom noe annet ble nevnt

står dette under kommentarer. I denne oppgaven presenteres resultatene som omhandler *Parkia biglobosa* og *Terminalia macroptera*.

Healerne i Siby og Dioïliaområdet ble hovedsakelig intervjuet på det lokale språket Bambara av Adiaratou Tologa og N’Golo Balo. Adiaratou Tologa fungerte også som tolk, og oversatte til engelsk. I Bandiagara ble intervjuene foretatt av Akouni Dugnon og oversatt til engelsk av Adiaratou.

7.4.1 Intervjuer i Sibyområdet

24. og 25. November 2008 ble 26 healere fra 3 ulike landsbyer intervjuet i Sibyområdet. Av disse var 18 menn, og 8 kvinner.

Parkia biglobosa

Parkia biglobosa ble brukt av alle 26 healerne. Bruken varierte, og det ble til sammen notert 23 forskjellige bruksområder. Noen healere anvendte *Parkia biglobosa* til flere forskjellige indikasjoner. Den hyppigst nevnte indikasjonen var innvendige sår (7), etterfulgt av malaria (5) og brystmerter (5). Det var også forskjell på hvilke deler av planten som ble anvendt. Stammebark, enten alene eller i kombinasjon med annet plantemateriale, ble hyppigst brukt, etterfulgt av blader. For flere detaljer, se tabell 7.1

Terminalia macroptera

Blant de 26 healerne befant det seg fire som ikke brukte *Terminalia macroptera* i sin praksis. Det ble notert 16 forskjellige bruksområder. De hyppigst nevnte indikasjonene var tannkjøttbetennelse(4), innvendige sår(3), hoste(3) og diaré(3). De andre indikasjonene ble bare nevnt en gang. Når det gjelder hvilke plantedeler som ble brukt varierer dette, men rot og blad dominerer. For flere detaljer, se tabell 7.2

Tabell 7.1 Informasjon om *Parkia biglobosa* i Sibyområdet

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Modibo Camara, 45 år, Djissoumana	Gulsott	Frøene i frukten	Pulveriserte frø blandes med vann	Spis 1 (voksne) eller ½ (barn) teglass morgen og kveld i 7 dager	Kan brukes av gravide
	Malaria	Frøene i frukten	Pulveriserte frø blandes med vann	Spis 1 (voksne) eller ½ (barn) teglass morgen og kveld i 7 dager	Kan brukes av gravide
Koumo Sidibe, 50 år, Djissoumana	Innvendige sår	Blanding av blader og stammebark + blader fra <i>Gardenia sokotensis</i>	Dekokt av 2 håndflatestore indre barkbiter + 4 (kvinne) eller 3 (mann) bladbunter fra <i>Parkia biglobosa</i> og <i>Gardenia sokotensis</i>	Drink 1 (voksne) eller ½ (barn) teglass morgen, middag og kveld i 3 dager.	Kan brukes av gravide. Nytt oppkok hver morgen i for å hindre bakterievekst. Svak laksativ effekt
Sakaba Camara, 79 år, Djissoumana	Magesmerter hos kvinner (menstrasjonssmerter)	Blader	Kutt bladene og lag dekokt	Dampbad av magen	Engangsbehandling
Neguè Gouibaly, ca 80 år, Djissoumana	«Sovesyke»	Blader	Dekokt	Ta dampbad av hele kroppen og vask deretter med dekoktet 1 gang daglig i 3 dager	Samme behandling for voksne og barn
Kouraba Traoré, ca 50 år, Djissoumana	Brystsmerter hos barn	Blader	Dekokt av 3 bladbunter	Vask barnets kropp morgen og kveld i 2 dager	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Maimona Gouibaly, ca 60 år, Djissoumana	Sår hals pga bakteriell infeksjon (halsbetennelse)	Blader	Dekokt	Dampbad av munnhulen 2 ganger daglig til frisk	Kan brukes av alle
Farima Kone, ca 80 år, Djissoumana	Sår hals	Blader	Dekokt av 4 bladbunter	Dampbad av munnhulen	Engangsbehandling. Samme behandling for voksne og barn
	Brystsmerter	Blanding av blader og stammebark	Dekokt	Vask kroppen med dekoktet 4 ganger	Samme behandling for voksne og barn
Massaba Kone, 83 år, Djissoumana	Kroppssmerter	Blader (eventuelt bark)	Dekokt	Drikk litt, vask deretter hele kroppen morgen og kveld i 2 dager.	Føler man fremdeles smerte etter 2 dager koker man nytt materiale, og fortsetter behandlingen i 2 dager til. Samme behandling for voksne og barn. Kan gi diaré pga tanninene i barken
Daouda Doumbia, 49 år, Djissoumana	Kroppssmerter	Stammebark	Dekokt	Vask kroppen morgen og kveld, dag 1 og 3	
	Astma	Stammebark	Dekokt	Vask kroppen med dekoktet og drikk ½ kaffekopp morgen og kveld, etter måltid, i 2 dager.	Samme behandling for voksne og barn

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Fouseeing Doumbia, 26 år, Djissoumana	Ukjent sykdom hos barn, med feber og kroppssmerte	Blanding av blader og stammebark	Dekokt av like mengder blader og indre stammebark	Drikk 1-2 spiseskjeer (små barn) eller 1 teglass (større barn) morgen, middag og kveld i 3 dager	
	Hodepine hos voksne	Stammebark	Dekokt	Vask hodet med dekoktet og tradisjonell kariteesåpe 3 (menn) eller 4 ganger (kvinner)	
Nanténe Camara, ca 80 år, Djissoumana	Hoste	Stammebark	Maserasjon av den indre barken	Drikk, ingen spesifikk mengde angitt	Samme behandling for voksne og barn
	Innvendige sår eller infeksjon hos barn	Stammebark	Dekokt	Vask kjønnsorganene, eller drikk 1-2 spiseskjeer morgen og kveld til man er frisk	Mange tanniner, bitter smak
	Malaria	Frukt og stammebark	Dekokt	Drikk ½ kaffekopp og vask hele kroppen med dekoktet morgen og kveld	Bitter smak
Broulage Traoré, 42 år, Djissoumana	Innvendige sår	Stammebark	Barkpulver	Løs 3 fingre pulver i vann og drikk 1 teglass morgen og kveld	
	Innvendige sår	Stammebark	Maserasjon av frisk bark	Drikk 1 teglass morgen og kveld. Til frisk, eller maksimum 1 ukes behandlingstid	
	«Verkefinger»	Stammebark	Dekokt	Hold fingeren i dekoktet en stund	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Talamba Kamala, 29 år, Djissoumana	Malaria	Rot	Dekokt	Drikk ½ kaffekopp(voksne) eller 1 teglass (barn) hver morgen till frisk	
	Hoste (små barn)	Indre del av stammebark	Maserasjon av den indre barken	½ teglass hver dag til frisk	
	Hoste (voksne)	Indre del av stammebark	Lag pulver av barken	Spis 1 spiseskje hver dag til frisk	
Sidiki Coulibaly, 58 år, Djissoumana	Innvendige sår	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 teglass (voksne) eller 1-2 spiseskjeer (barn) morgen og kveld i 1 uke	
	Innvendige sår	Stammebark + rotbark fra <i>Ximenia americana</i>	Dekokt av like mengder indre stammebark og rotbark	Drikk 1 teglass (voksne) eller 1-2 spiseskjeer (barn) morgen og kveld i 1 uke	
	Hemoroider	Stammebark	Barkpulver	1 full kaffekopp pulver kokes med 2 liter vann. Drikk 1 teglass, bruk resten av væsken som klyster. 1 gang daglig i 1 uke	
Bakary Traoré, 35 år, Djissoumana	Insomnia	Stammebark	Dekokt	Drikk 1(voksne) eller ½ (barn) kaffekopp ved sengetid til frisk	
	Insomnia	Stammebark	Barkpulver	Spis 1(voksne) eller ½ (barn) spiseskje ved sengetid til frisk	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Bamba Keita, 55 år, Djissoumana	Schistosomiasis (uriniform)	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 (voksne) eller ½ (barn) kaffekopp hver morgen, før mat, i 4 dager	Ikke stopp behandlingen selv om man blir kvalm og kaster opp
	Gulsott	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 (voksne) eller ½ (barn) kaffekopp hver morgen, før mat, i 4 dager	Ikke stopp behandlingen selv om man blir kvalm og kaster opp
Fafrémba Doumbia, 67 år, Djissoumana	Innvendige sår hos barn	Stammebark	Dekokt	Drikk 4 (jenter) eller 3 (gutter) håndfuller (voksen hånd), og vask barnet med resten av dekoktet	Engangsbehandling
	Dysenteri	Frukt	Pulverisert frukt	Spis 1 (voksne) eller ½ (barn) teglass morgen og kveld i 2 dager	Kan tilsette litt vann ved behov
Famoury Konate, ca 80 år, Kalassa	Magesår	Stammebark	Barkpulver	Bland 3 fingre pulver med grøt, vann eller noe annet varmt, morgen og kveld i 1 uke	Samme behandling for voksne og barn
	Innvendige sår	Stammebark	Barkpulver	Bland 3 fingre pulver med grøt, vann eller noe annet varmt, morgen og kveld i 1 uke	Samme behandling for voksne og barn
	Utvendige sår	Stammebark	Barkpulver	Dekk såroverflaten med barkpulver, en gang daglig til såret er borte	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
	Astma	Frøene i frukten	Frøene forkulles og pulveriseres	Pulveret blandes med litt salt, og 2 fingre pulver spises på grøt eller i vann, morgen og kveld, til krisen er over. Maksimum 1 uke	Dersom pulveret ikke er ordentlig forkullet kan man få bivirkninger, som kvalme. Samme behandling for voksne og barn
Bobo Camara, ca 80 år, Guena,	Malaria	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 (voksne) eller ½ (barn) kaffekopp morgen og kveld til frisk.	Føler seg normalt frisk etter 2-3 dager
	Gulsott	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 (voksne) eller ½ (barn) kaffekopp morgen og kveld til frisk.	Føler seg normalt frisk etter 2-3 dager
	Malaria	Blader	Dekokt	Drikk 1 kaffekopp morgen og kveld i 2-3 dager	
Lamine Coulibaly, 59 år, Djissoumana	Hemoroider	Stammebark + stammebark fra <i>Tamarindus indica</i>	Barkpulver	Bland like mengder pulver, og spis 1 spiseskje morgen og kveld til frisk	Kan tilsette litt vann ved behov.
	Hemoroider hos barn	Stammebark + stammebark fra <i>Tamarindus indica</i>	Barkpulver	Bland like mengder pulver, og spis 1 teskje morgen og kveld etter måltid. Bland 1 teskje pulver med vann og bruk som klyster. Til frisk	Kan tilsette litt vann ved behov.
	Gulsott som forårsaker gule øyne	Stammebark	Dekokt (kokes i 3-4 timer til sirupkonsistens)	Spis 2 spiseskjeer morgen og kveld i 3-7 dager	Svak laksativ effekt, men den er tilsiktet

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Salimata Keita, ca 60 år, Djissoumana	Brystsmerter hos barn	Blad fra unge trær	Dekokt	Vask barnets kropp med dekokt og såpe 4 ganger	
	Hoste hos voksne	Stammebark	Maserasjon av den indre barken	Drikk så mye man klarer i løpet av dagen til frisk	Lag ny hver morgen
Lamine Keita, 46 år, Djissoumana	Artrose, smerter i bena	Blader	Dekokt av 1 bladroll	Vask kneet med dekokt og kariteesåpe, 1 gang daglig i 3 (menn) eller 4 (kvinner) dager	
	Migrene	Blader	Dekokt av 3 (menn) eller 4 (kvinner) bladroller	Vask hodet med dekoktet og såpe 3 (menn) eller 4 (kvinner) ganger	Samme behandling for voksne og barn
Fasseng Camara, 70 år, Djissoumana	Hepatitt	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 kaffekopp (voksne) eller 1 teglass (barn) 1 gang daglig i 1 uke	
Sekou Coulibaly, 72 år, Djissoumana	Dysenteri med magesmerter	Stammebark	Maserasjon av friskt barkpulver	Drikk 1 kaffekopp	
	Dysenteri med magesmerter	Stammebark	Tørket barkpulver	Spis 5 fingre pulver	Samme behandling for voksne og barn
Nakari Kone, ca 80 år, Djissoumana	Brystsmerter	Blader + blader fra <i>Afrormosia laxiflora</i>	Dekokt	Dampbad av bryst, inhaler og vask kroppen med resten av dekoktet. 3 ganger for hele behandlingen	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
	Sår hals	Blad	Dekokt	Dampbad av munnhulen 3 ganger med samme materiale. Så nytt materiale	Samme behandling for voksne og barn
Niagalé Camara, 56 år, Djissoumana	Sår i munnen hos barn	Stammebark	Dekokt og barkpulver	Vask munnen med dekoktet, og påfør barkpulveret to ganger daglig	
	Brystsmerter hos barn	Blad	Dekokt	Vask barnets kropp med dekokt 4 (jenter) eller 3 (gutter) ganger	

Tabell 7.2 Informasjon om Terminalia macroptera i Sibyområdet

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Modibo Camara, 45 år, Djissoumana	Innvendige sår	Rot	Dekokt	Drikk 2 (voksne) eller 1 (barn) teglass morgen, middag og kveld i 4 dager	Ikke frisk etter 4 dager, fortsett i 4 dager til
Koumo Sidibe, 50 år, Djissoumana	Hodepine	Blad	Dekokt av 3 bladbunter og nok vann til å vaske hodet	Skyll hodet med dekoktet, vask med kariteesåpe og skyll hodet med dekoktet, 3 ganger daglig i 2 dager	Kan brukes av gravide
Sakaba Camara, 79 år, Djissoumana	Tannkjøttbetennelse	Frisk rot	Masser roten mellom hendene, og press deretter ut sevjen	Påfør sevjen i ren munn hver morgen til frisk	Kan brukes av alle
Neguè Gouibaly, ca 80 år, Djissoumana	Innvendige sår	Blad og rot	Dekokt av like mengder blad og rot	Drikk litt dekokt, og vask kroppen i resten, morgen og kveld til frisk	Kan brukes av alle
Kouraba Traoré, ca 50 år, Djissoumana	Kroppssmerter hos barn	Blad	Dekokt av 3 bladbunter	Vask kroppen med dekoktet, og masser så kroppen med kariteesmør, morgen og kveld i 2 dager	
Maimona Gouibaly, ca 60 år, Djissoumana	Brystsmerter	Blad	Dekokt (av kuttete blader)	Ta dampbad av brystet og vask hele kroppen med resten av dekoktet, 2 ganger daglig til frisk.	Samme dosering for voksne og barn
Farima Kone, ca 80 år, Djissoumana	Tannkjøttbetennelse	Frisk rot	Masser roten mellom hendene, og press deretter ut sevjen	Påfør sevjen i munnen 2 ganger daglig i 3 dager	Samme dosering for voksne og barn

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Massaba Kone, 83 år, Djissoumana	Ingen medisinsk bruk				
Daouda Doumbia, 49 år, Djissoumana	Tuberkulose (hoste)	Rot eller stammebark	Dekokt	Drikk ½ (voksne) eller ¼ (barn) kaffekopp morgen, middag og kveld i 4 dager	
	Tuberkulose (hoste)	Rot eller stammebark	Pulverisert rot eller stammebark	Ha 1 (voksne) eller ½ (barn) teskje på grøt, suppe eller lag infusjon med sukker. Spis/drikk morgen, middag og kveld i 4 dager	Kan brukes av alle
Fouseeing Doumbia, 26 år, Djissoumana	Hoste	Stammebark	Pulverisert stammebark	Bland pulveret med litt salt, spis så mye man orker når man hoster, mindre mengde for barn	Kan blandes med mat
Nanténe Camara, ca 80 år	Diaré	Rotbark	Dekokt	Drikk 1 teglass morgen, middag og kveld til frisk	Samme dosering for voksne og barn
Broulage Traoré, 42 år	Ingen medisinsk bruk				
Talamba Kamala, 29 år, Djissoumana	Hoste	Frisk stammebark	Maserasjon i kaldt vann	Drikk 1 (voksne) eller ½ (barn) teglass 1 gang daglig til frisk	
Sidiki Coulibaly, 58 år, Djissoumana	Inkontinens	Rot	Dekokt av ½ teglass pulverisert rot og 200-300 ml vann	Drikk alt rett før sengetid i 3-7 dager	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
	Dysenteri	Stammebark	Dekokt av 1 håndfull stammebark og ½ liter vann	Drikk 1 kaffekopp	Engangsbehandling
Bakary Traoré, 35 år, Djissoumana	Dysenteri og annen diaré	Rot	Dekokt	Drikk 1 teglass (voksne). Ikke mer enn 1 spiseskje til barn	Engangsbehandling
Bamba Keita, 55 år, Djissoumana	Diabetes	Blader og røtter	Dekokt	Drikk 1 kaffekopp morgen og kveld 5 dager på rad	
	Epilepsi	Blad	Dekokt av 3 (menn) eller 4 (kvinner) bladruller	Drikk 1 teglass og vask kroppen med dekoktet 1 gang daglig i 3 (menn) eller 4 (kvinner) dager	
Fafrémba Doumbia, 67 år, Djissoumana	Innvendige sår	Rotbark	Dekokt	Drikk 1 (voksne) eller ½ (barn) teglass morgen, middag og kveld i 3 (menn) eller 4 (kvinner) dager	
	Tannkjøttbetennelse	Frisk rotbark	Press barken i litt vann, slik at sevjen kommer ut	Vask munnen 2 ganger daglig til frisk	Samme dosering for voksne og barn
Famoury Konate, ca 80 år, Kalassa	Hårtap relatert til ukjent sykdom	Blad, stammebark og frukt	Dekokt av like mengder blad, stammebark og frukt	Vask kroppen og håret med dekoktet 1 gang daglig til man slutter å miste hår	
Bobo Camara, ca 80 år, Guena	Tannkjøttbetennelse	Rot	Dekokt	Vask munnen med dekoktet 2 ganger daglig til frisk	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Lamine Coulibaly, 59 år, Djissoumana	Innvendige sår	Rot	Dekokt (3-4 timer)	Drikk 2 (voksne) eller 1 (barn) spiseskje morgen og kveld i 1 uke	
	Feber hos barn	Rot	Dekokt	Vask barnet med dekoktet, morgen og kveld i 4 dager	
Salimata Keita, ca 60 år, Djissoumana	Ingen medisinsk bruk				
Lamine Keita, 46 år, Djissoumana	Infertilitet hos kvinner	Rotbark	Pulverisert rotbark	Spis 1 teskje pulver blandet med grøt eller annen væske, en gang daglig til man er gravid	
	Hoste	Unge blad	Dekokt	Drikk 1 teglass (voksne) eller 1 spiseskje (barn) morgen, middag og kveld til frisk	
Fasseng Camara, 70 år, Djissoumana	Ingen medisinsk bruk				
Sekou Coulibaly, 72 år, Djissoumana	Hoste	Stammebark	Maserasjon	Drikk 1 kaffekopp 3 ganger daglig til frisk. Barn, litt mindre mengde	
Nakari Kone, ca 80 år, Djissoumana	Innvendige sår	Rot	Dekokt	Drikk nok, til frisk	Kan brukes av alle
Niagalé Camara, 56 år, Djissoumana	Dermatitt hos barn	Blad eller rot	Dekokt	Vask barnet med dekoktet 3 (gutter) eller 4 (jenter) ganger	

7.4.2 Intervjuer i Bandiagaraområdet

27. og 28. November ble 14 healere fra 2 ulike landsbyer intervjuet i Bandiagaraområdet. Det var bare menn som ble intervjuet.

Parkia biglobosa

Parkia biglobosa ble brukt av 13 av 14 healere. Bruken varierte, og det ble notert 13 forskjellige bruksområder. Noen healere brukte *Parkia biglobosa* til forskjellige indikasjoner. Dysenteri (4), brannså (2) og betennelse i hud (2) var de eneste indikasjonene som ble nevnt mer enn en gang. Også her varierte det hvilke plantedeler som ble benyttet. Stammebark, enten alene eller i kombinasjon med annet plantemateriale, ble hyppigst brukt, etterfulgt av blader og frøene i frukten. For flere detaljer, se tabell 7.3

Terminalia macroptera

I Bandiagaraområdet var det bare fire healere som brukte *Terminalia macroptera*. Disse brukte planten mot gulsott (2), bevisstløshet (1) og konjunktivitt (1). Plantedelene de benyttet var stammebark og blader. I tillegg var det fire healere som benyttet loranthusen som av og til vokser på *Terminalia macroptera*. Denne brukte de mot gulsott(3) og reumatisme. For flere detaljer, se tabell 7.4

Tabell 7.3 Informasjon om *Parkia biglobosa* i Bandiagaraområdet

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Ousmane Timbiné, 58 år, Iriguli	Brannså	Stammebark	Barkpulver	Pulveret påføres, etterfulgt av sesamolje, 1 gang daglig til frisk	Vent til pulveret er borte med å påføre nytt
Drissa Timbiné, 45 år, Iriguli	Brannså	Stammebark	Barkpulver	Pulveret påføres, etterfulgt av sesamolje, 1 gang daglig til frisk	
Sene Tepsougue, 56 år, Iriguli	Migrene	Blad	Dekokt av 3 (menn) eller 4 (kvinner) bladruller	Dampbad av hodet, 2 ganger daglig til frisk	Samme behandling for voksne og barn
Amadou Bossoro Douguon, 58 år, Iriguli	Magesmerter	Blomster og blader	Dekokt av 3 (menn) eller 4 (kvinner) bladruller + 7 blomster	Drikk 4 (kvinner), 3 (menn) eller 2 (barn) håndfuller, og vask kroppen med resten av dekoktet	
	Gulsott med smerter i øynene	Stammebark	Dekokt av 4 barkbiter	Drikk 4 (kvinner) eller 3 (menn) håndfuller 2 ganger daglig i 8 dager	
	Betennelse i huden	Frøene i frukten	Frøene forkulles og pulveriseres	Påfør pulveret 2 ganger daglig til frisk. Kan blandes med smør om ønskelig	
Asseguerama Polo, 84 år, Iriguli	Betennelse i huden	Stammebark + stammebark fra <i>Vitex doniana</i>	Dekokt og barkpulver	Drikk 3 (menn) eller 4 (kvinner) håndfuller morgen og kveld, vask kroppen med dekoktet og påfør pulverblandingen på det infiserte området	
Kaliba Guindo, ca 84 år, Iriguli	Uklart syn	Frøene i frukten	Maserasjon	Drypp øynene morgen og kveld til frisk	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Issar Tapile, 64 år, Iriguli	Ingen medisinsk bruk				
Antandou Kassogou, 70 år, Iriguli	Dysenteri og diaré	Stammebark	Dekokt	Bruk dekoktet til å tilberede et måltid morgen og kveld. Spis måltidet	
Anou Karambe, 40 år, Iriguli	Malaria (feber)	Blad	Dekokt av 3 (menn) eller 4 (kvinner) bladruller	Drick 4 (kvinner) eller 3 (menn) håndfuller morgen og kveld i 1 uke	
Garsulo Dolo, 54 år, Iriguli	Dysenteri og diaré	Stammebark	Barkpulver	Spis 3 fingre pulver blandet med mat eller drikke, morgen, middag og kveld til frisk	
	Oppkast	Stammebark	Barkpulver	Spis 3 fingre pulver blandet med mat eller drikke	Engangsbehandling
Ogonidjou Guirou, 55 år, Banani	Slangebitt	Frukt, uten kapsel, men med frøene	Pulverisert frukt og frø	Bland pulveret med rød jord og påfør bittstedet	
	Hoste	Rot	Forkullet og pulverisert rot	Ta 2 fingre pulver 3 (menn) eller 4 (kvinner) ganger, bland med honning og spis om kvelden	
Seydou Guirou, 66 år, Banani	Dysenteri hos barn	Fruktkapselen	Pulverisert fruktkapsel	Bland 3 fingre pulver i grøten, morgen og kveld i 3 dager	
Seydou/Guinbogo Guirou, 69 år, Banani	Sår	Fruktkapselen	Frisk og hel kapsel	Fest kapselen over såret (som bandasje) Hjelper tilhelningen og forebygger infeksjon	
Ana Guirou, 38 år, Banani	Dysenteri hos barn	Stammebark	Dekokt	Drick 1 håndfull (voksen hånd) morgen og kveld til frisk	

Tabell 7.4 Informasjon om *Terminalia macroptera* i Bandiagaraområdet

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Ousmane Timbiné, 58 år, Iriguli	Ingen medisinsk bruk				
Drissa Timbiné, 45 år, Iriguli	Ingen medisinsk bruk				
Sene Tepsougue, 56 år, Iriguli	Ingen medisinsk bruk				
Amadou Bossoro Douguon, 58 år, Iriguli	Bevisstløshet	Ytre stammebark	Pulverisert stammebark	Påfør pulveret i nesen, bland med smør og påfør på huden. Når den bevisstløse våkner, bland pulveret med vann, og drikk	
Asseguerama Polo, 84 år, Iriguli	Ingen medisinsk bruk				
Kaliba Guindo, ca 84 år, Iriguli	Gulsott	Stammebark + stammebark fra <i>Angeissus leiocarpus</i> + rotbark fra <i>Strophantus sarmentosus</i>	Dekokt	Drikk 3 (menn) eller 4 (kvinner) håndfuller morgen og kveld i 5 dager	
Issar Tapile, 64 år, Iriguli	Konjunktivitt	Blad	Dekokt	Vask øynene med dekoktet morgen og kveld til frisk	
Antandou Kassogou, 70 år, Iriguli	Reumatisme	Loranthus	Dekokt	Drikk 3 håndfuller og ta dampbad av hele kroppen morgen og kveld til frisk	
Anou Karambe, 40 år, Iriguli	Ingen medisinsk bruk				

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Garsulo Dolo, 54 år, Iriguli	Ingen medisinsk bruk				
Ogonidjou Guirou, 55 år, Banani	Gulsott	Bladene til loranthusen	Dekokt	Drikk 3 (menn) eller 4 (kvinner) håndfuller morgen og kveld i 3 dager	
Seydou Guirou, 66 år, Banani	Gulsott	Loranthus	Dekokt	Drikk 3 (menn) eller 4 (kvinner) håndfuller og vask hele kroppen morgen og kveld i 3 dager	
Seydou/Guinbogo Guirou, 69 år, Banani	Gulsott	Loranthus	Dekokt	Drikk 3 (menn) eller 4 (kvinner) håndfuller og vask hele kroppen morgen og kveld i 3-4 dager	
Ana Guirou, 38 år, Banani	Kronisk gulsott	Stammebark	Dekokt	Bruk dekoktet til å tilberede en grøt, som spises morgen, middag og kveld til frisk	

7.4.3 Intervjuer i Dioilaområdet

I perioden 10.-13. desember ble 38 healere fra 4 ulike landsbyer intervjuet i Dioilaområdet. Blant de intervjuede healerne befant det seg 4 kvinner, resten var menn.

Parkia biglobosa

Av de 38 healerne som ble intervjuet var det 3 som ikke brukte *Parkia biglobosa*. 26 forskjellige bruksområder ble notert. Innvendige sår (11) utmerket seg som den hyppigste indikasjonen, etterfulgt av hodepine (5) og hemoroider (4). De andre bruksområdene ble bare nevnt en eller to ganger. Stammebark, enten alene eller i kombinasjon med annet plantemateriale, er den hyppigst brukte plantedelen, etterfulgt av blad. To av healerne nevnte at de brukte henholdsvis en sopp og en loranthus som vokser på *Parkia biglobosa*. Disse er ikke tatt med i resultatene. For flere detaljer, se tabell 7.5

Terminalia macroptera

Det var bare en healer som ikke brukte *Terminalia macroptera*. Bruksområdene varierte, og 29 forskjellige indikasjoner ble notert. Vaginal infeksjon (4) ble hyppigst nevnt, etterfulgt av dermatitt (2), kroniske sår (2), diaré (2), soppinfeksjon i munnen (2), gulsott (2) og magesmerter (2). De øvrige indikasjonene ble bare nevnt en gang. Blad, stammebark og rot var de mest brukte plantedelene. Det var 9 healere som benyttet loranthusen som av og til vokser på *Terminalia macroptera*, mot forskjellige indikasjoner. For flere detaljer, se tabell 7.6

Tabell 7.5 Informasjon om *Parkia biglobosa* i Dioïlaområdet

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Fousseyni Coulibaly, 37 år, Dioïla	Vaginal soppinfeksjon	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 (barn) eller 2 (voksne) teglass 1 gang daglig, og vask kjønnsorganene til frisk	
	Gulsott	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 (barn) eller 2 (voksne) teglass 1 gang daglig, og vask hele kroppen til frisk	
Gaoussou Fofana, 48 år, Dioïla	Vaginal soppinfeksjon	Stammebark	Dekokt	Drikk 250 ml og vask kjønnsorganene med dekoktet morgen og kveld i 1 uke	
Daouda Sidibé, 75 år, Dioïla	Innvendige sår	Sopp som vokser på <i>Parkia biglobosa</i>	Forkullet og pulverisert sopp	Spis pulver, 2-3 ganger per dag til frisk	Ingen spesifikk mengde angitt
Moussa Sidibé, 62 år, Dioïla	Ingen medisinsk bruk				
Kalifa Togola, 70 år, Dioïla	Innvendige sår	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 teglass morgen, middag og kveld i 3 dager	
	Innvendige sår	Stammebark	Barkpulver	Spis 1 teskje pulver morgen, middag og kveld i 3 dager	
	Innvendige sår	Frukt	Pulverisert frukt	Spis 1 teskje pulver morgen, middag og kveld i 3 dager	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
	Dysenteri	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 teglass morgen, middag og kveld i 3 dager	
	Dysenteri	Stammebark	Barkpulver	Spis 1 teskje pulver morgen, middag og kveld i 3 dager	
Mohamadou Diarra, 36 år, Dioïla	Sår hals	Blad	Dekokt	Innhaler dampen og drikk 1 (voksne) eller ½ (barn) kaffekopp 1 gang daglig til frisk.	
Mammadou Koniba Mariko; 73 år, Banco	Astma	Stammebark + Stammebark fra <i>Butyrospermum parkii</i>	Barkpulver blandet med salt	Spis 2 fingre pulverblanding (ca ½ teskje) 2 ganger daglig i inntil 5 dager. Barn halv dose	
Basameu Sangaré, 70 år, Banco	Pussbyller på hendene som verker	Stammebark	Dekokt	Ha dekoktet i en trebolle, og sitt med hendene i dekoktet i 1 time, 2 ganger daglig	Ikke ta hull på byllene. Bruk dekoktet om igjen, men kok det opp før bruk
Zan Traoré, 65 år, Banco	Hypertensjon	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 kaffekopp morgen og kveld, og vask kroppen med resten til frisk	
	Innvendige sår	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 kaffekopp morgen og kveld, og vask kroppen med resten til frisk	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
	Magesår	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 kaffekopp morgen og kveld, og vask kroppen med resten til frisk	
Adama Fomba, 69 år, Banco	Hoste	Fruktkapselen	Pulverisert fruktkapsel blandet med salt	Spis blandingen	Ingen spesifikk mengde eller behandlingstid. Samme behandling for voksne og barn
Bakary Fomba, 65 år, Banco	Hodepine	Stammebark + frukt fra <i>Solanum incanun</i> og gummi fra <i>Commiphora africana</i>	Pulverisert stammebark, frukt og gummi	Brenn pulverblandingen, dekk til hodet og inhaler røyken	
Mamary Tologa, 72 år, Banco	Eretil dysfunksjon	Rot	Dekokt	Kok roten sammen med kjøtt. Spis kjøttet og drikk dekoktet	Engangsbehandling
Sitab Fomba, 70 år, Banco	Innvendige sår	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 teglass (voksne) eller 1 håndfull (barn) morgen, middag og kveld til frisk	
Awa Fomba, 50 år, Banco	Ingen medisinsk bruk				

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Tenimba Coulibaly, ca 40 år, Banco	Innvendige sår	Stammebark	Dekokt og infusjon av barkpulvet	Drikk dekoktet, og vask kroppen med dekoktet. Drikk deretter 1 (voksne) eller ½ teglass (barn) infusjon morgen og kveld de neste 7 dagene	
Seydou Mariko, 33 år, Banco	Innvendige sår hos voksne	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 teglass morgen og kveld i 1 dag	
	Innvendige sår hos barn	Stammebark	Dekokt	Drikk ½ teglass morgen og kveld i 3 dager	
Abdoulaye Mariko, 40 år, Banco	Migrene	Stammebark og blader	Dekokt	Ta dampbad av hodet, vask hele kroppen, og drikk 4 (voksne) eller 2 (barn) teglass 2 ganger daglig til frisk.	
	Sopp i munnen	Stammebark og blader	Dekokt	Ta dampbad av munnhulen 2 ganger på en dag	Samme behandling for voksne og barn
Adama Fomba, 36 år, Banco	Magesmertetr hos kvinner (menstrasjonssmerter)	Stammebark	Pulverisert stammebark	Bland 1 teskje pulveret med suppe, grøt eller lignende og en gang daglig i 1 uke	
Nouhoum Mariko, ca 50 år, Banco	Infertilitet hos kvinner	Loranthus	Dekokt	Dampbad av magen, vask kroppen med dekoktet og drikk 1 teglass 1 gang daglig i 4 dager	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Chaka Mariko, 43 år, Banco	Innvendige sår hos barn	Stammebark	Maserasjon maserert fra morgen til kveld	Drikk 2 teglass morgen og kveld i 7 dager	
Youssof Mariko, 38 år, Banco	Forstoppelse med flatulens og magesmerter	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 teglass (voksne) eller 1 spiseskje (barn over 1 år) morgen, middag og kveld i 3 uker	
Madou Foussa Mariko, 60 år, Banco	Lungebetennelse	Blad fra unge trær	Dekokt	Drikk 1 (barn) eller 2 (voksne) teglass, og vask hele kroppen 2 ganger daglig i 4 dager	
Datique Coulibaly, 66 år, Beleco	Tannkjøttbetennelse	Stammebark	Pulverisert stammebark	Påfør pulveret på sårene 3 ganger daglig til frisk	Samme behandling for voksne og barn
Fanto Yaya Diabaté, 40 år, N'Diadougoutiguila	Hypertensjon	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 teglass morgen, middag og kveld i 1 uke	
	Hodepine	Stammebark	Pulverisert stammebark	Brenn pulveret og inhaler røyken, bland pulver med smør og påfør på hodet 2 ganger daglig til frisk	
Paul Diabaté, 63 år, N'Diadougoutiguila	Hemoroider	Rotbark	Forkullet og pulverisert rot	Påfør i rektum 3-4 ganger	
Michaele Diabaté, 52 år, N'Diadougoutiguila	Hemoroider	Stammebark	Dekokt	Vask hele kroppen med dekoktet 3-4 ganger	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
	Hemoroider	Frukt	Forkullet og pulverisert frukt	Påfør pulveret på hemoroidene 2 ganger daglig i 3 dager. Kan blandes med smør om ønskelig	
Sidiki Diarra, 50 år, N'Diadougoutiguila	Hodepine	Stammebark	Dekokt	Dampbad av hodet, drikk så mye du orker og vask hodet med dekoktet 2 ganger daglig til frisk	
Andre Dembele, 39 år, N'Diadougoutiguila	Røde øyne som gjør vondt	Stammebark	Dekokt	Vask øynene med dekoktet, til frisk	
Abraham Zamble Dembele, ca 90 år, N'Diadougoutiguila	Diaré og oppkast med feber hos barn	Stammebark	Dekokt	Drikk dekoktet og vask hele kroppen 3-4 ganger	
Bakary Fomba, ca 83 år, N'Diadougoutiguila	Brystsmerter hos barn	Blad	Kokte blader	Masser brystet med de kokte bladene, 1 gang daglig i 3 (gutter) eller 4 (jenter) dager	
Karim Fomba, 34 år, N'Diadougoutiguila	Ingen medisinsk bruk				
Touba Diarra, 54 år, N'Diadougoutiguila	Neurologisk malaria hos barn	Blad fra unge trær	Dekokt	Drikk 1 teglass morgen, middag og kveld i 3 (gutter) eller 4 (jenter) dager, og vask barnets kropp med dekoktet	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Brehima Samake, 72 år, Dioïla	Kroniske sår	Stammebark	Pulverisert stammebark	Påfør pulveret og dekk til såret 2 ganger daglig til frisk	
	Hodepine	Stammebark + Cucurbita sp. (Hele planten)	Dekokt av like mengder stammebark og plante	Varm en stein til den blir rødglødende, ha oppi dekoktet. Ta dampbad av hodet, og inhaler dampen. 2-3 ganger	
	Blødninger i svangerskap	Stammebark + Cucurbita sp. (Hele planten)	Blanding av 1 del pulverisert stammebark og 2 deler pulverisert plante	1 teskje pulverblanding blandes i 1 glass tykk melk. Drikk 2 ganger daglig til blødningen stopper	
Mamdou Diarrassouba, 55 år, Dioïla	Hemoroider	Stammebark + stammebark fra <i>Mangifera indica</i> + Stammebark fra <i>Sclerocarya birrea</i>	Dekokt	Drikk 1 teglass morgen, middag og kveld i 1-2 uker	
	Onchocercosis	Stammebark + stammebark fra <i>Mangifera indica</i> + Stammebark fra <i>Sclerocarya birrea</i>	Dekokt	Drikk 1 teglass morgen, middag og kveld i 1-2 uker	
	Innvendige sår	Stammebark + stammebark fra <i>Mangifera indica</i> + Stammebark fra <i>Sclerocarya birrea</i>	Dekokt	Drikk 1 teglass morgen, middag og kveld i 1-2 uker	

Navn, alder, landsby	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
	Mareritt	Blad	Pulveriserte blad	Bland pulveret med vann, og vask kroppen. Bland pulveret med grøt og spis	
Souleymane Togola, 51 år, Dioila	Magesår	Stammebark	Pulverisert stammebark	Spis 1 teskje pulver morgen og kveld til frisk	
	Innvendige sår	Stammebark	Pulverisert stammebark	Spis 1 teskje pulver morgen og kveld til frisk	
Mamadou Sidibe, 55 år, Dioila	Hodepine	Stammebark	Dekokt	Dampbad av hodet, 2 ganger daglig i 3 dager	
N'Golo Sidibe, 51 år, Dioila	Magesmertetr hos kvinner (menstrasjonssmerter)	Frukt, gammel	Dekokt	Drikk 2 teglass 1-2 ganger daglig til frisk	
	Innvendige sår	Stammebark	Dekokt	Bruk dekoktet som klyster 1 gang daglig i 3 dager	
Djoba Togola, 70 år, Dioila	Innvendige sår hos voksne	Stammebark	Pulverisert stammebark	Spis pulveret 2 ganger daglig til frisk	Ingen spesifikk mengde angitt
	Innvendige sår hos barn	Stammebark	Dekokt	Drikk 2 ganger daglig til frisk	Ingen spesifikk mengde angitt

Tabell 7.6 Informasjon om Terminalia macroptera i Dioïlaområdet

Navn, alder	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Fousseyni Coulibaly, 37 år, Dioïla	Dermatitt	Stammebark og rotbark	Dekokt (like mengder)	Drikk ½ liter (voksne) eller 1 teglass (barn) og vask kroppen med resten, morgen og kveld i 1 måned	
Gaoussou Fofana, 48 år, Dioïla	Når livmoren åpnes for tidlig hos en gravid kvinne	Loranthus	Dekokt av 1 håndfull pulverisert loranthus i kokende vann	Drikk ca 250 ml, 1-2 ganger i løpet av 3 dager	
	Dysmenhorea	Loranthus	Dekokt av 1 håndfull pulverisert loranthus i kokende vann	Drikk og ta dampbad av nedre mageregion	
Daouda Sidibé, 75 år, Dioïla	Uklart syn	Loranthus	Dekokt av 1 håndfull pulverisert loranthus i kokende vann	Ha en håndfull pulver i 1 liter vann, og vask øynene morgen og kveld til frisk	
Moussa Sidibé, 62 år, Dioïla	Kroniske sår	Rot	Pulverisert rot	Vask såret og påfør pulveret 2 ganger daglig til frisk	
	Ytre hemoroider	Rot	Pulverisert rot blandes med smør og påføres 3 ganger daglig i 3 dager		

Navn, alder	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
	Ammenorhoea	Stammebark	Maserasjon	Masserer over natten og drikk 1 kaffekopp 3 ganger daglig i 3 dager	
	Vaginal infeksjon	Rot	Dekokt	Vask kjønnsorganene med dekoktet og drikk 1 kaffekopp 2 ganger daglig til frisk	
Kalifa Togola, 70 år, Dioïla	Øyebetennelse med rennende øyne	Loranthus	Dekokt	Vask øynene med dekoktet morgen og kveld i 3 dager	
Mohamadou Diarra, 36 år, Dioïla	Hoste	Stammebark	Dekokt, start med 3 liter vann, og kok til det er 1 liter igjen	Drikk 1 (voksne) eller ½ (barn) teglass morgen og kveld i 7 dager	
Mammadou Koniba Mariko; 73 år, Banco	Hypertensjon med lammelse i den ene siden av kroppen	Stammebark + stammebark fra <i>Sclerocarya birrea</i>	Dekokt (like mengder)	Drikk 1 teglass og vask kroppen med dekoktet 1 gang daglig i 15-20 dager	
	Hypertensjon med lammelse i den ene siden av kroppen	Stammebark + stammebark fra <i>Sclerocarya birrea</i>	Pulverisert blanding	Spis ½ teskje pulver med mat eller vann 1 gang daglig	
Basameu Sangaré, 70 år, Banco	Sykdommer relatert til svangerskap	Loranthus	Dekokt	Vask kroppen med dekoktet 3 ganger	
Zan Traoré, 65 år, Banco	Soppinfeksjon i munnen	Rot	Dekokt	Drikk 1 (voksne) eller ½ (barn) kaffekopp morgen og kveld i 7 dager	

Navn, alder	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Adama Fomba, 69 år, Banco	Gulsott	Rot	Maserasjon i kaldt vann	Drikk 3 håndfuller	Engangsbehandling
Bakary Fomba, 65 år, Banco	Neurologisk sykdom med «brennende føtter»	Stammebark og rotbark	Dekokt	Sitt med føttene i dekoktet, 2 ganger daglig i 5 dager	
Mamary Tologa, 72 år, Banco	Malaria	Rot + rot fra <i>Blighia sapida</i>	Dekokt	Drikk 1(voksne) eller ½ (barn) kaffekopp og vask kroppen med dekoktet, morgen og kveld i 3-4 dager	
Sitab Fomba, 70 år, Banco	Kroppssmerter	Loranthus	Pulverisert loranthus	Ha pulveret i varmt vann, vask kroppen med blandingen og drikk en infusjon av 5 fingre pulver, morgen og kveld til frisk	
Awa Fomba, 50 år, Banco	Magesmerter hos kvinner (menssmerter)	Stammebark	Dekokt	Drikk 1 kaffekopp og ta dampbad av magen om morgenen til frisk	
Tenimba Coulibaly, ca 40 år, Banco	Magesmerter	Loranthus	Pulverisert loranthus	Ha pulveret i varmt vann, vask kroppen med blandingen og drikk en infusjon av 3 fingre pulver, morgen og kveld i 1 uke	
Seydou Mariko, 33 år, Banco	Vaginal soppinfeksjon	Blad	Forkullede og pulveriserte blad	Del pulveret i 2 deler, bland den ene med salt og spis. Den andre blandes med smør og påføres 1-2 ganger daglig i 2 dager	

Navn, alder	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Abdoulaye Mariko, 40 år, Banco	Gulsott	Stammebark og rotbark	Dekokt	Drikk 2 håndfuller og vask kroppen med dekoktet morgen og kveld i 3 dager	
Adama Fomba, 36 år, Banco	Sopp i munnen hos barn	Stammebark	Konsentrert dekokt	Bruk en finger og påfør i barnets munn 2 ganger daglig i 4 dager	
Nouhoum Mariko, ca 50 år, Banco	Tuberkulose	Stammebark og blad	Pulverisert stammebark og blad blandet med salt	Spis 1 (voksne) eller ½ (barn) teskje 3 ganger daglig i 3 dager	
Chaka Mariko, 43 år, Banco	Kroppssmerter hos barn	Loranthus	Dekokt	Vask barnet med dekoktet morgen og kveld i 4 dager	
Youssof Mariko, 38 år, Banco	Diabetes	Stammebark + stammebark fra <i>Sclerocarya birrea</i>	Dekokt	Drikk 1 (voksne) eller ½ (barn) teglass morgen og kveld i 15 dager	
Madou Foussa Mariko, 60 år, Banco	Rygg og brystmerter	Stammebark + loranthus	Dekokt	Vask kroppen med dekoktet 2 ganger daglig i 4 dager	
Datigue Coulibaly, 66 år, Beleco	Diaré	Rot	Dekokt	Drikk 1 teglass 1 gang daglig til frisk	For mye fører til konstipasjon
Fanto Yaya Diabaté, 40 år, N'Diadougoutiguila	Mot betennelse	Rot	Pulverisert forkullet rot	Bland pulveret med smør og påfør 2 ganger daglig i 1 uke	
Paul Diabaté, 63 år, N'Diadougoutiguila	Reumatisme	Stammebark + stammebark fra <i>Erythrina senegalensis</i>	Dekokt	Drikk 1 kaffekopp og vask kroppen med dekoktet, 3 ganger daglig til frisk	

Navn, alder	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Michaele Diabaté, 52 år, N'Diadougoutiguila	Astma hos barn	Blad fra unge trær	Dekokt	Drikk ca 75 ml 3 ganger daglig i 5 dager	
	Kroppssmerter	Stammebark	Dekokt	Vask kroppen med dekoktet	
Sidiki Diarra, 50 år, N'Diadougoutiguila	Smerter i nedre mageregion	Stammebark	Dekokt	Dampbad av magen, og drikk så mye du orker til frisk	
Andre Dembele, 39 år, N'Diadougoutiguila	Infertilitet hos kvinner	Stammebark	Pulverisert stammebark blandet med litt salt	Spis pulveret alene eller sammen med litt mat, til man er gravid	
Abraham Zamble Dembele, ca 90 år, N'Diadougoutiguila	Ingen medisinsk bruk				
Bakary Fomba, ca 83 år, N'Diadougoutiguila	Bump i hodet hos nyfødte barn	Unge blad	Press juicen ut av de ferske bladene	Påfør juicen 3 ganger daglig til bumpen er borte	Er som oftest borte etter 3 dager
Karim Fomba, 34 år, N'Diadougoutiguila	Vaginal infeksjon	Rot	Pulverisert rot	Påfør 2 fingre pulver 2 ganger daglig til frisk	
Touba Diarra, 54 år, N'Diadougoutiguila	Feber på natten hos barn	Loranthus	Dekokt	Vask barnet med dekoktet	
Brehima Samake, 72 år, Dioïla	Feber hos barn	Blad	Dekokt	Vask barnet med dekoktet så mange ganger som mulig	
	Dysenteri	Rot	Maserasjon	Drikk 2 teglass daglig til frisk	
	Dysenteri	Rot	Dekokt	Drikk 2 teglass daglig til frisk	

Navn, alder	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Mamdou Diarrassouba, 55 år, Dioïla	Kroniske sår	Rot eller stammebark	Pulverisert rot eller stammebark	Påfør pulveret 1 gang daglig i 1 uke	
	Dysmenorrhea	Rot eller stammebark	Pulverisert rot eller stammebark	1 teskje mikses med grøt og spises 1 gang daglig i 1-2 uker	
	Syfilis	Rot eller stammebark	Pulverisert rot eller stammebark	1 teskje mikses med grøt og spises 1 gang daglig i 1-2 uker	
	Dermatitt som klør	Blad	Infusjon av pulveriserte blad	Drikk infusjonen og vask kroppen med den.	
	Dermatitt som klør	Blad	Dekokt	Vask kroppen med dekoktet og drikk dekoktet	
Souleymane Togola, 51 år, Dioïla	Mareritt hos barn	Blad	Dekokt	1 spiseskje 1 gang daglig i 1 uke	
	Smerter i øyet	Blad	Dekokt	Vask øynene med dekoktet morgen og kveld i 1-2 måneder	
	Når tennene kommer ut	Blad	Dekokt	1 spiseskje 1 gang daglig i 1 uke	
Mamadou Sidibe, 35 år, Dioïla	Vaginal infeksjon	Blad	Dekokt	Drikk 1 kaffekopp og vask kjønnsorganene med dekoktet morgen og kveld i 1 uke	
N'Golo Sidibe, 51 år, Dioïla	Ørebetennelse	Rot eller stammebark	Dekokt	Bland dekoktet med kariteesmør og ha i ørene, 3 ganger	

Navn, alder	Indikasjon	Plantedel	Tilberedning og bruk	Dosering	Kommentarer
Djoba Togola, 70 år, Dioila	Innvendige sår	Stammebark	Pulverisert stammebark	Bland pulveret med mat, spis 2 ganger daglig til frisk	

Ordforklaring til tabell 7.1 -7.6

Teglass: En bestemt størrelse på ett glass, ca 75 ml (glass nummer 8).

Bunt: En bestemt størrelse på innsamlet og bundet plantemateriale

Antall fingre: Mål for pulverisert plantemateriale. Indikerer antall fingre brukt som en ”klype”

Dekokt: Plantemateriales varmes på flamme i en mengde vann i en gitt tid

Dampbad: Den aktuelle kroppsdelen plasseres slik at den kommer i kontakt med dampen, som strømmer opp fra en varm løsning.

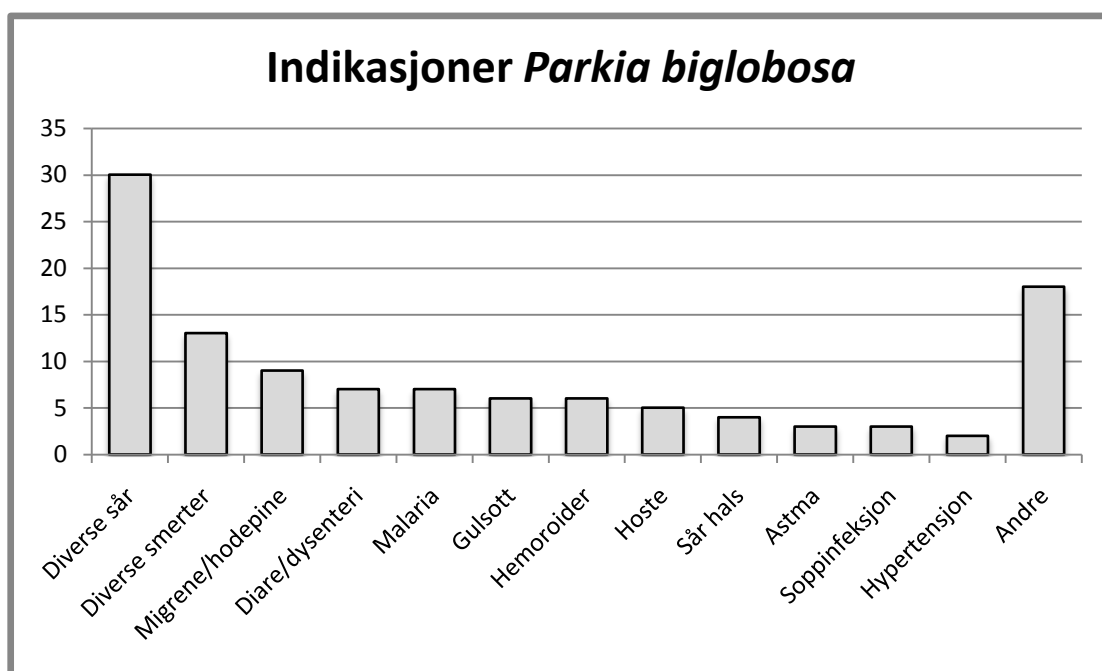
Maserasjon: En ekstraksjon hvor plantematerialet blandes med kaldt vann

7.5 Oppsummering av resultater fra healerintervjuene

7.5.1 *Parkia biglobosa*

Det var til sammen 4 healere som ikke brukte *Parkia biglobosa* i sin praksis. De lokale språkene har sine egne navn på planter, og *Parkia biglobosa* er kjent som ”Nere” på bambara, og som ”Porgo”, ”Yulo” og ”Doniene” på dogon.

De 74 healerne som brukte *Parkia biglobosa* nevnte til sammen ulike 41 indikasjoner. Ved nærmere gjennomgåelse av indikasjonene ble det besluttet å slå sammen noen av disse. Magesår, innvendige sår, utvendige sår, kroniske sår, brannsår, sår i munnen og tannkjøttbetennelse ble for eksempel slått sammen til indikasjonen ”diverse sår, inkludert betennelse”. 18 av indikasjonene ble bare nevnt 1 gang.



Figur 7.2: Antall healere som nevnte de forskjellige indikasjonene

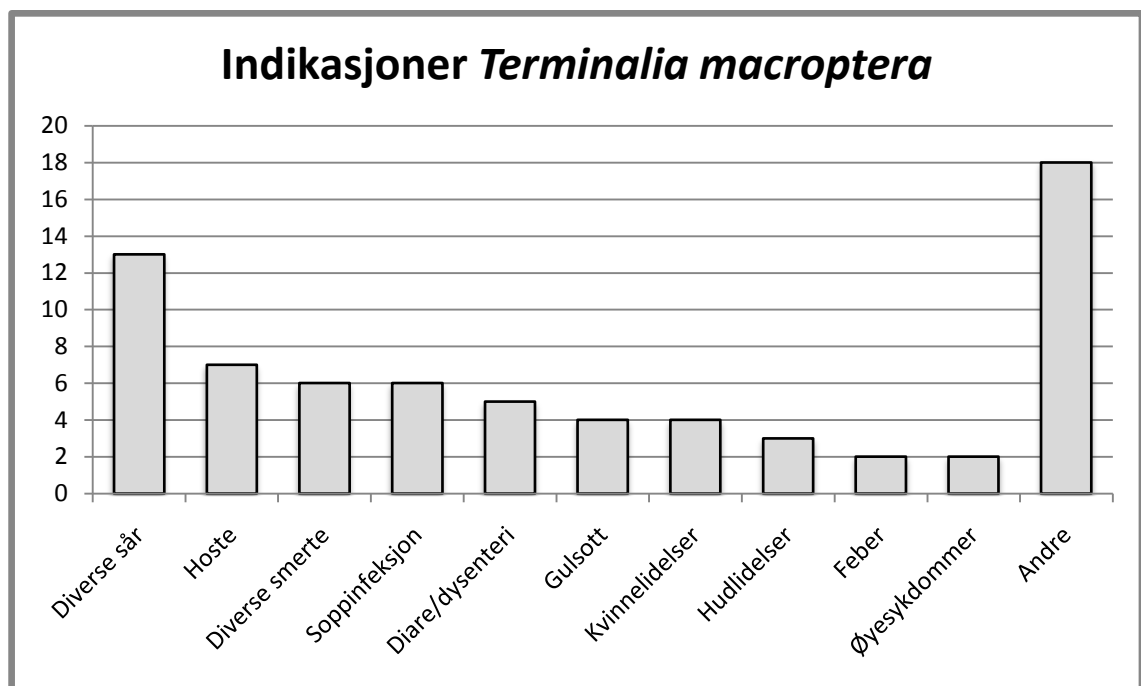
Som vist i figur 7.2 er den hyppigst nevnte indikasjonen for *Parkia biglobosa* diverse sår, etterfulgt av diverse smerter.

Stammebark er den mest brukte plantedelen. Denne kan tilberedes på mange forskjellige måter, men noe av det vanligste er enten å lage et dekokt av barken, eller å male den opp til pulver. Pulveret kan også bruke på flere forskjellige måter, både utvortes og innvortes.

7.5.2 *Terminalia macroptera*

Det var til sammen 11 healere som ikke brukte *Terminalia macroptera* i sin praksis. Planten er også kjent under navnet "Woloba" på bambera, og "Bosokouko" på dogon.

Healerne som ble intervjuet nevnte til sammen 45 forskjellige indikasjoner. 5 av disse indikasjonene gjaldt bruk av loranthusen, og er derfor utelatt fra figur 7.3. Også her var mange av bruksområdene veldig like, og ble derfor slått sammen i større indikasjonskategorier. 17 av indikasjonene ble bare nevnt en gang.

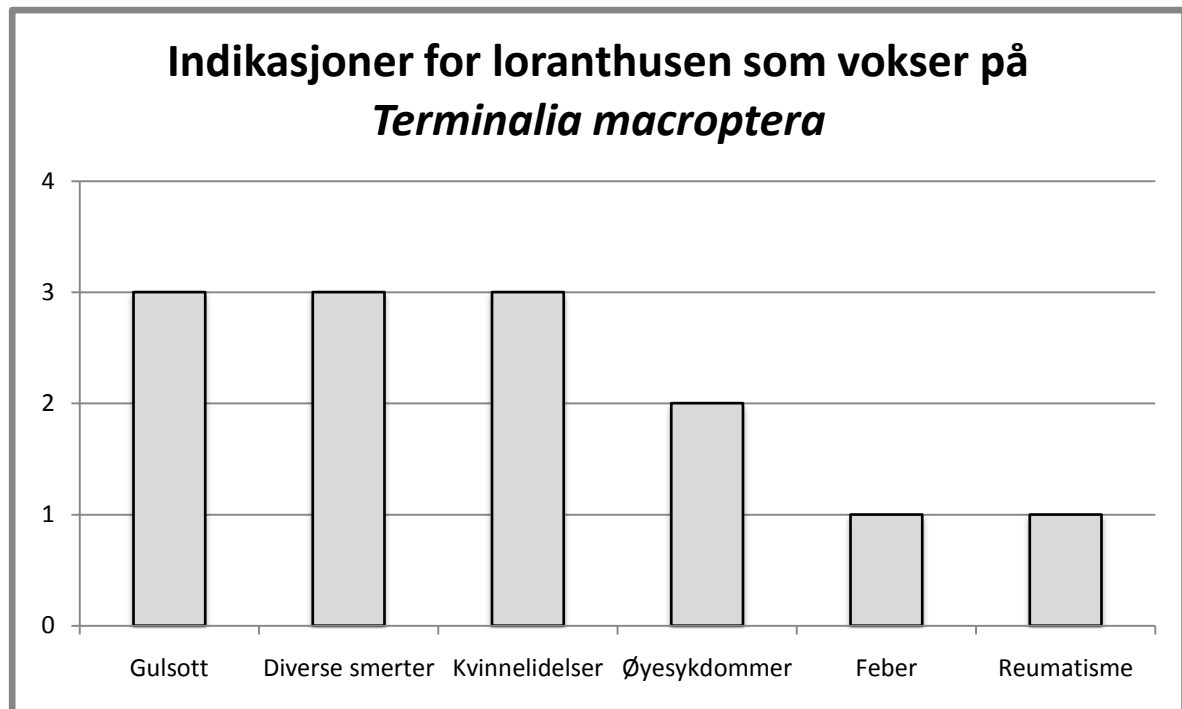


Figur 7.3: Antall healere som nevnte de forskjellige indikasjonene

Som vi kan se av figur 7.3 er diverse sår den mest nevnte indikasjonen for *Terminalia macroptera*, etterfulgt av hoste.

Her er rot, blad, og stammebark tilnærmet like mye brukt. Noen healere bruker også kombinasjon av flere deler fra samme plante, eller plantedeler fra andre planter. Forskjellige tilberedelsesmåter eksisterer, men dekokt er mest populært. Dette kan drikkes eller brukes til å vaske kroppen med. Man kan også inhalere dampen som dannes når dekoktet koker.

I Bandiagaraområdet og Dioïlaområdet brukte noen av healerne loranthusen som vokser på *Terminalia macroptera*. Loranthusen er en egen planteart, og behandles derfor for seg selv.



7.4 Antall healere som nevnte de forskjellige indikasjonene

8. KONKLUSJON

Målet med denne oppgaven var todelt. Polysakkarider fra *Terminalia macroptera* skulle isoleres og undersøkes med tanke på karbohydratsammensetning, struktur og aktivitet i biologiske systemer. I tillegg skulle healere intervjues i forbindelse med etnofarmakologiske studier i Mali.

Analyse av karbohydratinnhold og bindingsforhold viste innhold av vanlige pektinstrukturer som AG-I, AG-II, RGI og HG. Alle rækstraktene og forbindelser isolert etter ionebytterkromatografi inneholder en stor andel terminale polysakkarider, noe som tyder på en høy andel forgrenede pektiner. Innholdet av AG-II i TM50WS1, TM50WS1GalI, TM100WS1 og TM100WS1GalII ble bekreftet ved hjelp av Yariv-testen.

Bindingsforholdene gir mistanke om AG-II-innhold i alle fraksjonene utenom TM100WRÅ og TM100WN. De enzymatisk degraderte fraksjonene TM50WS1GalI og TM100WS1GalI inneholder sannsynligvis en høyere andel RG-I.

De vandige nøytrale fraksjonene inneholder høyst sannsynlig fruktaner.

Etanolfraksjonene, samt TM50WRÅ og TM100WRÅ viser større aktivitet i komplementfikseringstesten enn PM II. De vandige rækstraktene viser redusert aktivitet etter opprensing ved hjelp av ionebytterkolonne. Den enzymdegraderte fraksjonen TM100WS1GalI viser større aktivitet i komplementfikseringstesten enn TM100WS1, mens TM50WS1 og TM50WS1GalI har tilnærmet lik aktivitet.

Alle rækstraktene og fraksjonene som har blitt rensset opp ved hjelp av ionebytterkromatografi viser større evne enn medium til å indusere B-celleproliferasjon. TMERÅ, viser den aller største evnen til å indusere B-celleproliferasjon, etterfulgt av TMES1, TM100WS1, TM100WN og TMEN, som alle viser større evne enn de positive kontrollene, LPS og PMII, til å indusere B-celleproliferasjon.

TM100WS1, TM100WN, og TMES1 stimulerer makrofager til å frigjøre mer NO. Denne responsen er doseavhengig.

78 tradisjonelle medisinmenn i Siby-, Bandiagara- og Dioilaområdet ble intervjuet om bruken av *Parkia biglobosa* og *Terminalia macroptera*. 74 healere brukte *Parkia biglobosa* i sin praksis. De hyppigste indikasjonene var diverse sår, diverse smerter og

migrene/hodepine. 67 healere brukte *Terminalia macroptera* i sin praksis. De hyppigst nevnte indikasjonene var diverse sår, hoste og diverse smerte.

9. REFERANSER

- ALUKA. (2009). "Terminalia macroptera Guill. & Perr." fra <http://www.aluka.org/action/showCompilationPage?doi=10.5555/AL.AP.COMPILATION.PLANT-NAME-SPECIES.TERMINALIA.MACROPTERA&cookieSet=1>. Hentet 7.5.2009
- Amersham og Biosciense (2000). ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub).
- Arbonnier, M. (2004). Combretaceae. Trees, shrubs and lianas of West African dry zones, Margraf Publishers GmbH: s 275.
- Benen, J. A. E. og Visser, J. (2002). Polygalacturonases. Handbook of Food Enzymology. Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J. og Wong, D. W. S. New York, Marcel Dekker: s 857-863.
- BIO-RAD (2000). Bio-Gel® P Polyacrylamide Gel Instruction Manual.
- Biosupplies_Australia_Pty_Ltd Yariv reagents - For detection and quantitation of arabinogalactan-proteins, Biosupplies Australia Pty Ltd.
- Brummer, Y. og Cui, S. W. (2005). Understanding Carbohydrate Analysis. Food Carbohydrates Chemistry. Physical Properties, and Applications. Cui, S. W. Boca Raton, Taylor & Francis: s 70-72.
- Chambers, R. E. og Clamp, J. R. (1971). "An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials." Biochem J **125**(4): 1009-1018.
- CIA. (2009). "The World Factbook - Mali." fra <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/ml.html>. Hentet 6.5.2009
- Ciucanu, I. og Kerek, F. (1984). "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates." Carbohydrate Research **131**: 209-217.
- Complex_Carbohydrate_Research_Center. RG II. <http://www.ccruc.uga.edu/~mao/rg2/intro.htm>
- Diallo, D., Paulsen B. S. (2000). Pharmaceutical research and traditional practitioners in Mali: Experiences with benefit sharing. In Responding to Bioprospecting from biodiversity in the South to medicines in the North. Svarstad H, D. S. Oslo, Spartacus forlag AS: s 133-144.
- Garland_Science. (2005). "Komplementaktivering." fra <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Immunology/Students/spring2006/Finley/C3.html>. Hentet 6.5.2009
- GE Healthcare Bio-Sciences AB (2005). Instructions 71-5017-96 AF.

- Greibrokk, T., Lundanes, E. og Rasmussen, K. E. (1998). Eksklusjonskromatografi (gelkromatografi). Kromatografi: separasjon og deteksjon. [Oslo], Universitetsforlaget: s 80-100.
- Greibrokk, T., Lundanes, E. og Rasmussen, K. E. (1998). Ionebytterkromatografi. Kromatografi: separasjon og deteksjon. [Oslo], Universitetsforlaget: s 60-79.
- Inngjerdingen, K. (2000). Metoder. Sårhelende planter i Mali, A. Videre studier over Glinus Oppositifolius, B. Feltarbeid i Dogonland og Sikasso, Universitetet i Oslo: s 39-41.
- Inngjerdingen, K. (2000). Metoder. Sårhelende planter i Mali, A. Videre studier over Glinus Oppositifolius, B. Feltarbeid i Dogonland og Sikasso, Universitetet i Oslo: s 48-53.
- Iwu, M. M. (2002). Ethnobotanical approach to pharmaceutical drug discovery: strengths and limitations. Ethnomedicine and drug discovery. Iwu, M. M., Wootton, J. C. Amsterdam, Elsevier: s 309-320.
- Izydorczyk, M. (2005). Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. Food Carbohydrates. Cui, S. W. Boca Raton, Taylor & Francis group: s 1-66.
- Jansen, P. C. M. og Cardon, D. (2005). Dyes and Tanning, Plant Resources of Tropical Africa 3, PROTA.
- Kim, J.-B. og Carpita, N. C. (1992). "Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles." Plant Physiology **98**(2): 646-653.
- Michaelsen, T. E., Gilje, A., Samuelsen, A. B., Høgåsen, K. og Paulsen, B. S. (2000). "Interaction Between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of *Plantago major* L." Scandinavian Journal of Immunology **52**(5): 483-490.
- Molecularexpressions. (2005). Cell wall figure.
<http://www.molecularexpressions.com/cells/plants/images/cellwallfigure1.jpg>
- Nelson, D. L. og Cox, M. M. (2004). Lehninger Principles of Biochemistry: s 254-255.
- Parham, P. (2005). The Immune System. New York, Garland Science: s 205-222.
- Parham, P. (2005). Elements of the immune system and their role i defence. The immune system. New York, Garland Science: s 11-15.
- Parham, P. (2005). T Cell-mediated immunity. The immune system. New York, Garland Science: s 151-154.
- Paulsen, B. S. og Barsett, H. (2005). Bioactive pectic polysaccharides. Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use. Berlin, Springer-Verlag Berlin. **186**: s 69-101.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. (2004). Gasskromatografi. Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: s 193-211.

- Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A. og Doco, T. (2003). "A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function." Biochimie **85**(1-2): 109-121.
- Promega Corporation (2005). Griess Reagent System. I Technical Bulletin. INSTRUCTION FOR USE OF PRODUCT G2930. Madison, Promega Corporation.
- Samuelsson, G. (2004). Drugs of Natural Origin. Kristianstad, Apotekarsocieteten.
- Sand, O., Sjaastad, Ø. V. og Haug, E. (2001). Immunsystemet. Menneskets fysiologi. Oslo, Gyldendal Norsk forlag: s 360-376.
- Sanon, S., Ollivier, E., Azas, N., Mahiou, V., Gasquet, M., Ouattara, C. T., Nebie, I., Traore, A. S., Esposito, F., Balansard, G., Timon-David, P. og Fumoux, F. (2003). "Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso." Journal of Ethnopharmacology **86**(2-3): 143-147.
- Schepetkin, I. A. og Quinn, M. T. (2006). "Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential." International Immunopharmacology **6**(3): 317-333.
- Schultes, R. E. (1993). Amazonian Ethnobotany and the Search for New drugs. Symposium on Ethnobotany and the Search for New Drugs, Fortaleza, Brazil, John Wiley & Sons Ltd.
- Silva, O., Ferreira, E., Pato, M. V., Canica, M. og Gorries, E. T. (2002). "In vitro anti-Neisseria gonorrhoeae activity of Terminalia macroptera leaves (vol 211, pg 203, 2002)." FEMS Microbiology Letters **217**(2): 269-+.
- Silva, O., Ferreira, E., Pato, M. V. og Gomes, E. (1997). "Guinea-Bissau's plants: In vitro susceptibility studies on Neisseria gonorrhoeae." International Journal of Pharmacognosy **35**(5): 323-328.
- Silva, O., Gomes, E. T., Wolfender, J. L., Marston, A. og Hostettmann, K. (2000). "Application of high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry to the characterisation of ellagitannins from Terminalia macroptera roots." Pharmaceutical Research **17**(11): 1396-1401.
- Sveaas, A. (2007). Metoder. Immunmodulerende polysakkarider isolert fra Biophytum petersianum Klotzsch. Etnofarmakologiske studier i Mali, Universitetet i Oslo: s 56.
- Taiz, L. og Zeiger, E. (2006). Cell Walls: Structure, Biogenesis, and Expansion. Plant Physiology. Sunderland, Sinauer Associates: s 350-374.
- U.S. Department of Transportation. (2007). Map of Mali.
http://www.faa.gov/AIRPORTS_AIRTRAFFIC/AIR_TRAFFIC/PUBLICATIONS/ifim/country_list/index.cfm?countryCode=ml

-
- UNDP. (2008). "Human Development Indices: A statistical update 2008 - HDI rankings." fra <http://hdr.undp.org/en/statistics/>. Hentet 28.3.2009
- USDA. (2009). "Classification for Kingdom Plantae Down to Genus Terminalia L." fra <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=TERMI>. Hentet 23.4.2009
- Voragen, A. G. J., Daas, P. J. H. og Schols, H. A. (2000). Enzymes as tools for structural studies of pectins. Bioactive Carbohydrate Polymers),. Paulsen, B. S., Kluwer Academic Publishers: s 129-145.
- WHO. (2006). "Country Health System Fact Sheet 2006 Mali." fra http://www.afro.who.int/home/countries/fact_sheets/mali.pdf. Hentet 1.4.2009
- WHO. (2008). "Traditional medicine." fra <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/index.html>. Hentet 27.3.2009
- Yamada, H. og Kiyohara, H. (1999). Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. In Immunomodulatory Agents from Plants;. Wagner, H. Basel, Birkhauser Verlag: s 161–202.